



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Química Orgánica**



**2-ALQUIL-2-CARBOXIAZETIDINAS COMO  
INDUCTORES DE GIROS INVERSOS:  
ANÁLISIS CONFORMACIONAL EN PÉPTIDOS  
MODELO Y APLICACIÓN A LA SÍNTESIS DE  
MIMÉTICOS DE NEUROTROFINAS.**

**TESIS DOCTORAL**

**JOSÉ LUIS BAEZA GARCÍA**

**Directora: Dra. Mercedes Martín Martínez  
Madrid, 2008**



*El trabajo descrito en la presente Memoria ha sido realizado en el Instituto de Química Médica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, siendo posible gracias a una beca predoctoral FPI concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia.*

*En primer lugar quiero agradecer a mi directora de Tesis, la Dra. Mercedes Martín Martínez, la dedicación y paciencia que ha mostrado en todo momento, desde mis inicios hace ya más de cuatro años, hasta ahora. Siempre ha permanecido disponible cuando me surgía cualquier duda o problema, incluso el más ínfimo. Sus consejos, tanto personales como profesionales, me han sido de gran ayuda. Gracias.*

*También agradecer a la Dra. M<sup>a</sup> Teresa García López, jefa del grupo de investigación, todo su apoyo. Asimismo, agradezco a las Dras. Rosario Herranz y Marta Gutiérrez, miembros del grupo de investigación, la ayuda prestada. Especialmente quiero agradecer a la Dra. Rosario González Muñiz todo el interés, dedicación y ayuda que ha mostrado conmigo, y a la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Pérez de Vega que siempre está dispuesta a sacarte una sonrisa.*

*Al Dr. David Andreu por haberme acogido tan bien en su grupo de investigación cuando realicé una estancia de tres meses en Barcelona. Asimismo, quiero dar las gracias a la gente del grupo, muy especialmente a Javi, Carmen y a la Dra. Beatriz García por sus buenos consejos y por las risas que nos echamos de vez en cuando.*

*Al Dr. S. Jaffrey y al Dr. Guillermo Gerona del Weill Medical College de la Universidad de Cornell, por la realización de los ensayos biológicos para los miméticos de BDNF.*

*A la Dra M<sup>a</sup> Ángeles Jiménez del Instituto de Química Física “Rocasolano” por la ayuda con los espectros de los miméticos de BDNF. Muy especialmente a la Dra. Clara Santiveri por toda la ayuda recibida.*

*A la Dra. Lourdes Infantes del Instituto de Química Física “Rocasolano” por la eficaz labor en la realización de los estudios de Rayos X.*

*A todo el personal de los servicios técnicos del centro de Química Orgánica Manuel Lora Tamayo: RMN, IR, espectrometría de masas y microanálisis.*

*A la Dra. Pilar Goya, directora del Instituto de Química Médica, por las facilidades dadas en todo momento.*

*A M<sup>a</sup> Ángeles Cano, Juan Carlos y M<sup>a</sup> Luisa, por su ayuda con los papeleos y por ayudarme en las gestiones administrativas.*

*Al Dr. Tomás Torres y a la Dra. Purificación Vázquez que me permitieron comenzar en el mundo de la investigación en la UAM. Doblemente, agradecer al Dr.*

*Tomás Torres, tutor de esta Tesis, su interés y atención. Agradecer también a toda la gente del grupo, muy especialmente a Juanjo y Bea, todos los buenos momentos pasados.*

*Al Dr. Vicente Arán y a la Dra. Nadine Jagerovic por sus buenos consejos y por ser como son.*

*A los compañeros con los que he compartido laboratorio durante estos años: M<sup>a</sup> Ángeles, que me enseñó un montón cuando llegué novato al instituto y que siempre recordaré, a Diego, el último novatillo que ha tenido que sufrirnos más de una vez, a Mayte, que siempre está dispuesta para ayudar en lo que haga falta, y a todos los irlandeses que pasaron por el laboratorio y que apenas tuve tiempo de conocer. Muy especialmente, quiero agradecer a Paula todas las risas y los buenos ratos que he pasado con ella, así como el saber estar ahí cuando ha tenido que escuchar mis penas...*

*Al grupo de póquer que hemos formado, José Cumella (el que nunca pierde), Felipe (no te olvidaré Knot), Quique (¿volverás a ser jornalero?), y muy especialmente a Ángela, compañera de carrera, de trabajo, de quedadas, de risas y de tristezas, sin la que sin duda no habría podido conseguir mucho de lo que soy ahora. Muchas gracias, os lo agradecemos mi cartera y yo.*

*A todos los compañeros de Instituto que me dejó por el camino, muy especialmente a Maribel por todas las risas de las comidas, Cristina (ya te queda menos Cristi!), M<sup>a</sup> Cruz (que no me iba a olvidar de tí gemela) y a mis compañeros del laboratorio 355. En particular, agradezco a Sergio todos los buenos ratos que hemos pasado dentro y fuera del trabajo, y todas las “enseñanzas” que he recibido de él. Eres el más grande, gracias crack.*

*A toda la gente del barrio, a la gente que quedábamos en “el parque” y a la peña de Muñote. Muy especialmente a Moja, Chino, José, Mon, Fores, Cuervo, Manolo, Jaco, Fran, Santi, Tracas, Raquel, Alex, Nacho, Chapis y todos los que seguro me olvido.*

*A Manolo y Bárbara por su amistad sincera y por todas las quedadas en casa (porque fuera ya pocas veces..).*

*A Olga, que ha sabido ser lo suficientemente paciente como para soportarme durante más de cuatro años ya (dicen las malas lenguas que es una santa). Gracias por apoyarme siempre que lo he necesitado, ojalá que los próximos tiempos juntos sean aún mucho mejores.*

*A mi familia, especialmente a mis padres, mis hermanos, mis sobrinos y a la “familia política”, que me han aguantado durante un montón de años. Por fin acabo!*

*A todos, de nuevo, gracias.*

## ÍNDICE

	Página
NOTA SOBRE PUNTUACIÓN.....	9
NOTA SOBRE NOMENCLATURA.....	9
ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	11
<b>INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES.....</b>	<b>15</b>
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	17
OBJETIVOS GENERALES.....	23
<b>CAPÍTULO 1: MODELOS TETRAPEPTÍDICOS QUE INCORPORAN DERIVADOS DE 2-CARBOXIAZETIDINA Y PROLINA EN POSICIÓN i+1 E i+2.....</b>	<b>25</b>
1.1. INTRODUCCIÓN.....	27
1.2. ANTECEDENTES INMEDIATOS.....	35
1.3. OBJETIVOS.....	37
1.4. MODELOS TETRAPEPTÍDICOS QUE INCORPORAN DERIVADOS DE 2-CARBOXIAZETIDINA Y PROLINA EN POSICIÓN i+1 (R-CO- Xaa-Ala-NHMe).....	39
1.4.1. Síntesis.....	39
1.4.2. Estudios conformacionales.....	53
1.4.2.1. Estudios teóricos.....	53
1.4.2.2. Estudios de IR.....	60
1.4.2.3. Estudios de RMN.....	61
1.5. MODELOS TETRAPEPTÍDICOS QUE INCORPORAN DERIVADOS DE 2-CARBOXIAZETIDINA Y PROLINA EN POSICIÓN i+2 (R-CO- Ala-Xaa-NHMe).....	69
1.5.1. Síntesis.....	69
1.5.2. Estudios conformacionales.....	74
1.5.2.1. Estudios teóricos.....	74
1.5.2.2. Estudios de IR.....	83

1.5.2.3. Estudios de RMN.....	84
1.5.2.4. Cristalografía de Rayos X.....	91
1.6. CONCLUSIONES.....	97
1.7. PARTE EXPERIMENTAL.....	99
1.7.1. Preparación de aminoácidos y otros productos de partida.....	100
1.7.2. Síntesis de derivados Pmb-Azx-Phe-NHChx.....	110
1.7.3. Síntesis de Z-( <i>R,S</i> )-Aza-2-(+)-mentol [( <i>R,S</i> )-19b].....	112
1.7.4. Preparación de derivados dipeptídicos Boc- y Z-Xaa-Ala-OMe y Z-Ala-Xaa-OMe.....	113
1.7.5. Saponificación de dipéptidos con ésteres C-terminales.....	119
1.7.6. Preparación de derivados dipeptídicos con grupos amida C-terminales.....	120
1.7.7. Productos secundarios obtenidos en las reacciones de aminólisis.....	131
1.7.8. Reacciones de <i>N</i> -acilación de derivados dipeptídicos.....	132
1.7.9. Estudios de Dinámica Molecular.....	147
1.7.10. Cristalografía de Rayos X.....	149
 <b>CAPÍTULO 2: ANÁLOGOS CONFORMACIONALMENTE</b>	
RESTRINGIDOS DE FRAGMENTOS DE NGF Y BDNF.....	153
2.1. INTRODUCCIÓN.....	155
2.2. OBJETIVOS.....	163
2.3. ANÁLOGOS DE FRAGMENTOS DE NGF IMPORTANTES PARA LA ACTIVIDAD.....	165
2.3.1. Diseño.....	165
2.3.2. Síntesis.....	171
2.3.3. Estudio conformacional por RMN.....	174
2.4. MIMÉTICOS DE FRAGMENTOS DE BDNF IMPORTANTES PARA LA ACTIVIDAD.....	183
2.4.1. Diseño.....	183
2.4.2. Síntesis.....	190
2.4.3. Estudios de RMN.....	199

2.4.4. Estudios biológicos.....	208
2.5 CONCLUSIONES.....	211
2.6. PARTE EXPERIMENTAL.....	213
2.6.1. Preparación de productos de partida en disolución.....	214
2.6.2. Procedimiento general de síntesis en fase sólida.....	221
2.6.2.1. Métodos analíticos.....	221
2.6.2.1.1. Ensayo de ninhidrina.....	221
2.6.2.1.2. Ensayo del cloranilo.....	222
2.6.2.1.3. Ensayo de <i>p</i> -nitrofenilester del rojo disperso I cualitativo.....	222
2.6.2.1.4. Ensayo de Gisin.....	223
2.6.2.2. Protocolos de síntesis en fase sólida.....	224
2.6.2.2.1. Incorporación de Fmoc-aminoácidos para análogos de NGF.....	224
2.6.2.2.2. Incorporación de Fmoc-aminoácidos para análogos de BDNF.....	225
2.6.2.2.2.1. Anclaje del primer aminoácido a la resina.....	225
2.6.2.2.2.2. Protocolo general de síntesis Fmoc/ <sup>t</sup> Bu.....	225
2.6.2.2.2.3. Protocolo general de eliminación del grupo alilo...	226
2.6.2.2.2.4. Protocolo general de ciclación intramolecular.....	227
2.6.2.3. Síntesis en fase sólida de análogos de NGF.....	227
2.6.2.3.1. Síntesis de Asp-Azo-Xaa-Gly; Xaa= Lys, Arg.....	227
2.6.2.3.2. Síntesis de H-Asp-Ile-( <i>R,S</i> )-Azk-Gly-OH · 2 TFA [( <i>R,S</i> )-52].....	230
2.6.2.3.3. Síntesis de Asp-Xaa-Lys-Gln; Xaa= Azg, Pro, α-MePro	231
2.6.2.3.4. Síntesis de Asp-Xaa-Yaa-Gln; Xaa= Aze, Glu, Gly. Yaa= Lys, Azk.....	234
2.6.2.4. Síntesis en fase sólida de miméticos de BDNF.....	237
2.6.2.4.1. Síntesis de péptidos cíclicos miméticos del loop 2 de BDNF.....	237

2.6.2.4.1.1. Síntesis de ciclo(Val-Ser-Lys-Xaa-Yaa); Xaa= Gly, $\beta$ Ala. Yaa= Azg, Chx.....	237
2.6.2.4.1.2. Síntesis de ciclo(Val-Ser-Lys-Xaa-Aza); Xaa= Gly, $\beta$ Ala.....	243
2.6.2.4.2. Síntesis de péptidos cíclicos miméticos del loop 4 de BDNF [ciclo(Asp-Ser-Lys-Lys-Arg-Xaa); Xaa= Chx, Azg].....	247
2.6.3. Evaluación de la actividad biológica de los miméticos de BDNF.....	250
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>253</b>



## NOTA SOBRE PUNTUACIÓN

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso de puntuación en la numeración inglesa, se ha utilizado este sistema en la Memoria de esta Tesis. Así, las cifras decimales se indican con punto en lugar de con coma, aceptado por la Real Academia Española de la Lengua en el diccionario panhispánico de dudas, desde su primera edición en Octubre de 2005 (<http://buscon.rae.es/dpdI/>).

## NOTA SOBRE NOMENCLATURA

A lo largo de esta Memoria se ha utilizado la nomenclatura y simbolismos de aminoácidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB (“Nomenclature and Symbolism for Aminoacids and Peptides”, *Pure & Appl. Chem.* **1984**, 56, 595-674. <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/iubmb.html#03>).

Mientras no se indique lo contrario, los aminoácidos pertenecen a la serie natural L, y en el caso de los residuos de azetidina, tienen estereoquímica S en el carbono 2 del anillo de azetidina. Las sustituciones en los grupos funcionales de las cadenas laterales se indican entre paréntesis, inmediatamente después del símbolo de tres letras del aminoácido.

En cuanto a los péptidos, el residuo que tiene el grupo amino libre, o no acilado por otro aminoácido, se denomina N-terminal y el que tiene el grupo carboxilo libre se denomina C-terminal. Tanto para nombrarlos como para representarlos gráficamente, se comienza por el residuo N-terminal, seguido de los aminoácidos internos en orden, para finalizar con el residuo C-terminal.

Para las azetidinas derivadas de aminoácidos se ha propuesto una nueva nomenclatura basada en la notación utilizada para aminoácidos. Las dos primeras letras (Az) indican el anillo de azetidina, mientras que la tercera letra se corresponde con la notación de una letra del aminoácido correspondiente. Así, Aza se correspondería con la

azetidina derivada del aminoácido alanina, Azg derivaría de glicina, Azf de fenilalanina, etc, mientras que Azx indicaría una azetidina derivada de cualquier aminoácido. La excepción a esta nomenclatura la constituye la azetidina derivada de norleucina (Azo), ya que el aminoácido norleucina (Nle) no posee símbolo de una letra al no ser un aminoácido proteinogénico, y su primera letra, N, ya está asignada en la notación de una letra por el aminoácido Asn. Así, la segunda letra de norleucina (O), fue la adoptada para formar las tres letras que definen a esta azetidina derivada de norleucina (Azo).

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

En esta Memoria se han empleado los acrónimos y abreviaturas recomendados en *Guidelines for Authors (J. Org. Chem.* **2008**, 73). Algunas abreviaturas poco frecuentes se indican a continuación:

Al	alilo
AMBER	“Assisted Model Building with Energy Refinement”
Aza	2-Metilazetidina-2-carboxilato
Aze	2-(2-Carboxietil)-azetidina-2-carboxilato
Azf	2-Bencilazetidina-2-carboxilato
Azg	Azetidina-2-carboxilato
Azk	2-(4-Aminobutil)-azetidina-2-carboxilato
Azo	2-Butilazetidina-2-carboxilato
BAC <sub>6</sub> c	Ácido (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> )-2-aminociclohexanoico
BDNF	“Brain derived neurotrophic factor”
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo
BOP	Hexafluoruro de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)-fosfonio
BSA	Albúmina de suero bovino
BTC	Carbonato de bis(2,2,2)tricloroetilo
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DSC	Carbonato de <i>N</i> -succinimida
DTT	Ditiotreitol
EDT	Etanoditiol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HBSS	Disolución salina equilibrada de Hank

HBTU	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -benzotriazol- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-uronio
HMBC	Correlacion heteronuclear a larga distancia
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
FCS	Suero fetal bovino
$\alpha$ -MePro	$\alpha$ -Metilprolina
NGF	“Nerve growth factor”
nOe	Efecto nuclear Overhauser
NT	Neurotrofina
OBn	Benciloxilo
Pbf	2,2,4,6,7-Pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo
PBS	Tampón fosfato salino
Piv	Pivaloilo
Pmb	<i>p</i> -(Metoxi)bencilo
ppb	Partes por billón
PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(pirrolidinio)fosfonio
Rdto.	Rendimiento
RMN	Resonancia magnética nuclear
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico
TA	Tioanisol
TFFH	Hexafluorofosfato de fluoro- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilformamidinio
TIS	Triisopropilsilano
Xaa	Cualquier aminoácido
Z	Benciloxicarbonilo

Esta Tesis ha sido realizada en el Instituto de Química Médica (CSIC). Se enmarca dentro de los proyectos SAF 2003-07207-C02-01, GR/SAL/0846/2004 y SAF 2006-01205.

El autor agradece la financiación otorgada por el Ministerio de Educación y Ciencia mediante la concesión de una beca FPI (BES-2004-3405), gracias a la que ha sido posible la realización de este trabajo.



## **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES**

---





## **Introducción general.**

Un gran número de procesos celulares implican interacciones específicas péptido-proteína o proteína-proteína, como las interacciones antígeno-anticuerpo, o la organización de sitios activos de enzimas oligoméricas o receptores. Además, participan en numerosos procesos biológicos, desde la comunicación intercelular hasta la muerte celular programada<sup>1-4</sup>. En la actualidad se ha pasado de la visión clásica de la función de una proteína como la acción local de una sola molécula proteica, a la visión post-genómica que define la función de la proteína como un enrejado de interacciones con otras moléculas<sup>5-8</sup>. Así, se sabe que las proteínas no ejercen sus acciones aisladamente, sino formando parte de complejos proteicos, bien temporales o permanentes, y que la especificidad de esta unión va a determinar sus funciones. Dada la importancia de estas redes de interacción, una regulación inadecuada puede conducir a procesos patológicos y al desarrollo de diversas enfermedades, que se pueden asociar a interacciones aberrantes péptido-proteína o proteína-proteína, bien a través de la pérdida de una interacción esencial, o a través de la formación de complejos proteicos en una concentración, tiempo o localización inapropiada<sup>9-11</sup>. Por tanto, el entendimiento de las bases moleculares del reconocimiento péptido-proteína o proteína-proteína es uno de los retos en investigación biomédica. Además, estas interacciones se han convertido en un grupo importante de dianas para el desarrollo de herramientas farmacológicas y para la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos.

Hasta hace una década, los sistemas proteína-proteína se consideraban dianas de alto riesgo, difíciles de abordar con péptidos convencionales, peptidomiméticos o moléculas pequeñas debido a que estas interacciones normalmente ocurren sobre una superficie relativamente extensa, que puede exceder el área potencial de unión de una molécula de pequeño tamaño<sup>12-14</sup>. Además, muchas interacciones consisten en epítomos de unión discontinuos de la secuencia primaria de las proteínas, lo que dificulta el diseño racional de nuevas moléculas que los imiten<sup>15</sup>. Finalmente, las superficies de interacción son a menudo planas, por lo que resulta más complejo obtener moduladores que para interfaces que poseen cavidades bien definidas. Sin embargo, estudios estructurales de RMN y cristalografía de Rayos X combinados con mutagénesis dirigida, han mostrado que en muchos casos sólo un pequeño segmento de la interfaz es responsable de la mayoría de la energía libre de unión (“hot spot”)<sup>16-19</sup>. Además, se ha observado que, con

frecuencia, los residuos de aminoácidos que forman los “hot spots” tienden a estar agrupados en la superficie proteica y rodeados de aminoácidos energéticamente menos importantes. Por tanto, se puede pensar que cavidades y protuberancias definidas por estos “hot spots” pueden ocuparse o mimetizarse, respectivamente, por moléculas de bajo peso molecular. En este sentido, se ha dedicado gran esfuerzo a la caracterización de los aminoácidos importantes en las interacciones proteína-proteína, a la identificación de los motivos estructurales comunes a las interfaces de interacción de diferentes proteínas y al mapeo de las superficies de contacto, que posibiliten abordar la búsqueda de moduladores externos<sup>20,21</sup>. Estos estudios han permitido cambiar la visión predominante de hace años y así, han ido apareciendo una serie de ejemplos que muestran que ciertas moléculas pequeñas son capaces de modular estas interacciones<sup>22-27</sup>, abriendo la puerta para explorar esta aproximación en la búsqueda de nuevos fármacos.

Por otra parte, hay que considerar que dada la diversidad de las interfaces de interacción proteica, pueden existir algunas que no tengan las propiedades adecuadas para su modulación por moléculas pequeñas. Por lo tanto, es importante la evaluación de las propiedades estructurales y fisicoquímicas de las interfaces seleccionadas<sup>21,28,29</sup>. Así, por ejemplo, se pueden analizar los residuos y la forma de la superficie de interacción y aquellas en las que los residuos clave estén distribuidos a lo largo de la superficie o en las que no se puedan identificar cavidades presentarán menos probabilidades de éxito.

Aunque hay ejemplos de anticuerpos y péptidos de mediano tamaño que pueden bloquear interacciones proteína-proteína<sup>30,31</sup>, el número de moléculas pequeñas capaces de modularlas es más limitado. Mayor éxito se ha conseguido en la modulación de interacciones péptido-proteína, ya que este tipo de interacciones resulta más fácilmente abordable debido al menor tamaño de los péptidos<sup>32</sup>. Las estrategias más habituales para la búsqueda de moduladores de interacciones péptido-proteína o proteína-proteína se pueden agrupar en dos aproximaciones principales: el diseño basado en la estructura y los métodos combinatorios. Cuando se carece de información estructural de un complejo proteico, la evaluación masiva de compuestos es el método de elección. En este sentido, se puede realizar una primera selección de moduladores peptídicos empleando colecciones de péptidos, tanto procedentes de quimiotecas de péptidos sintéticas<sup>33</sup> como expresados en la superficie de fagos<sup>34</sup>. Los péptidos identificados constituirían un buen punto de inicio para el descubrimiento de nuevos moduladores y, en algunos casos, podrían ser utilizados incluso como fármacos útiles. Si se han identificado los

aminoácidos importantes para la interacción, otra alternativa es la búsqueda de moduladores peptídicos óptimos evaluando quimiotecas, en este caso dirigidas, en las cuales todos los péptidos contienen esos aminoácidos clave<sup>35</sup>. Posteriormente, aquellos péptidos que hayan mostrado cierta actividad, pueden optimizarse mediante la incorporación de aminoácidos no naturales u otras modificaciones químicas. Por otra parte, en las aproximaciones de química combinatoria, también se han utilizado quimiotecas de moléculas pequeñas para la búsqueda de modulares de interacciones proteicas, que se encuentran recogidas en diversas recopilaciones<sup>24-27</sup>.

El conocimiento de la estructura tridimensional de los complejos péptido-proteína o proteína-proteína permite utilizar aproximaciones de diseño racional en la búsqueda de moléculas sintéticas capaces de mimetizar, estructural y funcionalmente, la región de interacción de la proteína diana<sup>24,25,27,36-39</sup>. Así, un análisis detallado de estas interacciones puede permitir la identificación de residuos claves, la detección de cavidades en la superficie de interacción, o bien predecir potenciales sitios de unión a partir de datos estructurales de proteínas aisladas. Seguidamente, se podrían seleccionar compuestos que contengan los grupos químicos importantes para la actividad, en la disposición espacial adecuada, mediante un cribado virtual de bases de datos de moléculas pequeñas que cumplan los requisitos extraídos de los datos experimentales. Alternativamente, los estudios de modelización molecular pueden guiar la búsqueda de esqueletos moleculares restringidos donde anclar los residuos esenciales implicados en la unión, proporcionándoles la orientación apropiada.

Dentro de las metodologías de diseño racional, una aproximación útil es el diseño y síntesis de esqueletos que sean capaces de reproducir la conformación y propiedades electrónicas de los epítomos funcionales presentes en los péptidos bioactivos o en las interfaces de interacción de las proteínas nativas (miméticos de los elementos de la estructura secundaria peptídica). En este sentido, indicar que en las interfaces de interacción proteína-proteína se han encontrado todos los elementos más comunes de la estructura secundaria peptídica, hélices  $\alpha$ , láminas  $\beta$  y giros inversos<sup>12,13,15</sup>, y que cada uno de ellos se ha identificado como perteneciente a determinados “hot spots”, mientras que en el campo de las interacciones péptido-proteína se ha observado que un buen número de receptores de siete hélices transmembrana (7TM) acoplados a proteína G reconocen a ligandos con estructura de giro inverso<sup>32</sup>. En la búsqueda de miméticos de estos elementos, la aproximación inicial es normalmente la preparación de péptidos

cíclicos, seguida de una reducción gradual del carácter peptídico hasta alcanzar compuestos de naturaleza no peptídica. Otra estrategia es la incorporación de miméticos ya conocidos de los elementos de estructura secundaria peptídica, que adecuadamente sustituidos han conducido a moduladores de interacciones proteicas de interés biológico<sup>27,36,40</sup>.

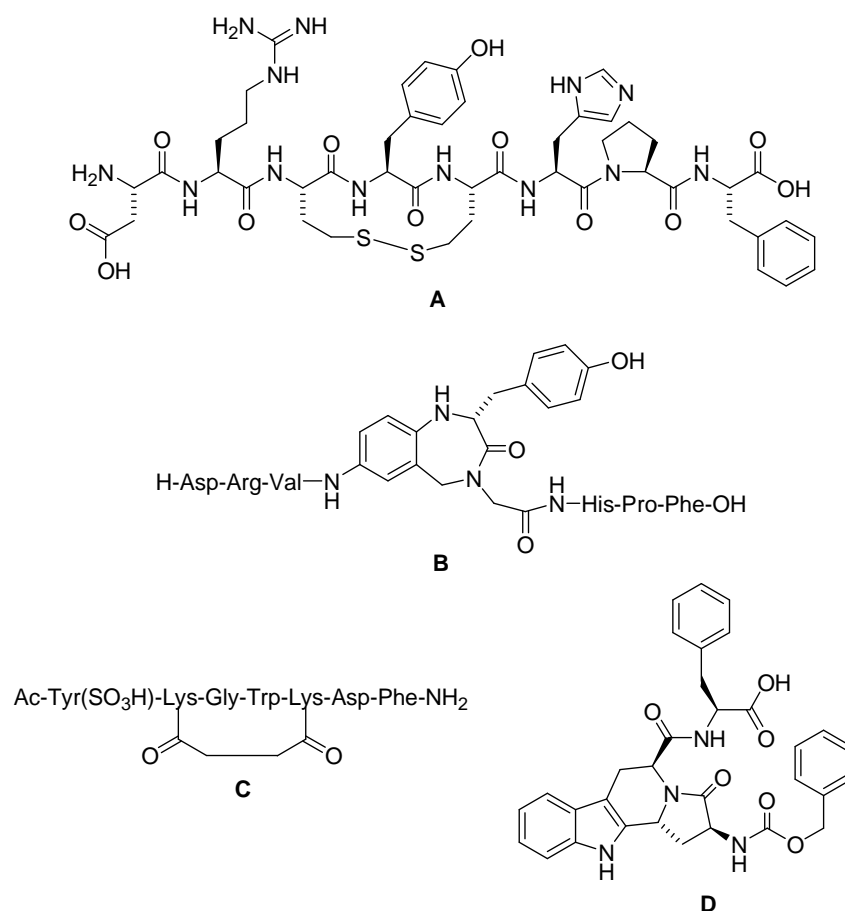


Figura 1

Como ejemplos ilustrativos de la aplicación de miméticos de estructura secundaria peptídica, se han seleccionado una serie de compuestos capaces de modular interacciones péptido-proteína o proteína-proteína en las que están involucrados diferentes giros inversos. Dentro de las interacciones péptido-proteína, como se ha comentado, un buen número de ejemplos se encuentran en el campo de los receptores 7TM acoplados a proteína G<sup>32</sup>. En la Figura 1 se encuentran recogidos algunos ejemplos

de péptidos y moléculas pequeñas, conformacionalmente restringidos, capaces de unirse a estos receptores. Así, el estudio de una serie de análogos cíclicos del octapéptido lineal angiotensina II (AII), péptido implicado en el mantenimiento de la tensión arterial, ha proporcionado un agonista, que posee actividad contráctil y afinidad por los receptores de AII similar a los del péptido natural (Figura 1, **A**)<sup>41</sup>. Por otra parte, la incorporación de miméticos de giros  $\gamma$  en la secuencia de la AII ha conducido a inhibidores selectivos de los receptores de angiotensina II, como el derivado de benzodiazepina **B**<sup>42</sup>. Otros ejemplos representativos se encuentran en el campo de la colecistoquinina (CCK)<sup>43</sup>, hormona peptídica y neurotransmisor implicada en la regulación gastrointestinal y el comportamiento. Así, tanto la incorporación de restricciones conformacionales mediante ciclación, como la introducción del mimético de giro  $\beta$  2-amino-3-oxohexahidroindolizino[8,7-*b*]indol-5-carboxilato (IBTM), han conducido a la obtención bien de un agonista de los receptores CCK2 (Figura 1, **C**)<sup>44</sup>, como a un antagonista potente y selectivo de los receptores CCK1 (Figura 1, **D**)<sup>45</sup>.

En el campo de las interacciones proteína-proteína, nos encontramos con numerosos ejemplos de antagonistas de integrinas con estructura de giro inverso. Las integrinas están formadas por la asociación no covalente de subunidades de glicoproteínas de transmembrana,  $\alpha$  y  $\beta$ , que median procesos de adhesión celular. Se sabe que el fragmento Arg-Gly-Asp (RGD), presente en proteínas de la matriz extracelular, es un elemento común del epítipo de unión a las integrinas. Inicialmente se desarrollaron miméticos cíclicos de este fragmento como el derivado **E**<sup>46</sup> (Figura 2), que en disolución presenta una conformación caracterizada por la presencia de un giro  $\beta$  II' y otro  $\gamma$ , y que mostró mejores afinidades que el correspondiente péptido lineal. Posteriormente, fue posible reducir la flexibilidad conformacional de estos péptidos mediante la introducción de diferentes miméticos de giros inversos manteniendo la capacidad para interferir en la interacción de las integrinas y sus receptores (Figura 2, **F**)<sup>47</sup>. Otros ejemplos se encuadran en el campo de las neurotrofinas, factores de crecimiento homodiméricos implicados en el control de la supervivencia y diferenciación celular, como se detallará en el capítulo 2 de esta Tesis. En este caso, una de las estrategias utilizadas fue la preparación de péptidos cíclicos mediante la introducción de puentes disulfuro en los fragmentos peptídicos correspondientes a los giros  $\beta$  de las neurotrofinas, que proporcionó una serie de péptidos, entre ellos el derivado **G**<sup>48</sup>, capaces de inhibir la interacción entre la neurotrofina, NGF, y sus receptores. Posteriormente se disminuyó el tamaño y carácter peptídico de estos

análogos, generando quimiotecas dirigidas de peptidomiméticos con interesantes propiedades biológicas (Figura 2, **H**)<sup>49</sup>. Finalmente, la incorporación de miméticos de giros  $\beta$  o  $\gamma$  en secuencias de péptidos biológicamente activos ha proporcionado compuestos que presentaron diversas actividades biológicas. Entre ellos se pueden señalar los compuestos **I**<sup>50,51</sup> (mimético del segundo activador mitocondrial de caspasa, Smac) y **J**<sup>52</sup> (inhibidor de la proteasa de HIV ), Figura 2, que incorporan miméticos de giro  $\beta$  y  $\gamma$ , respectivamente.

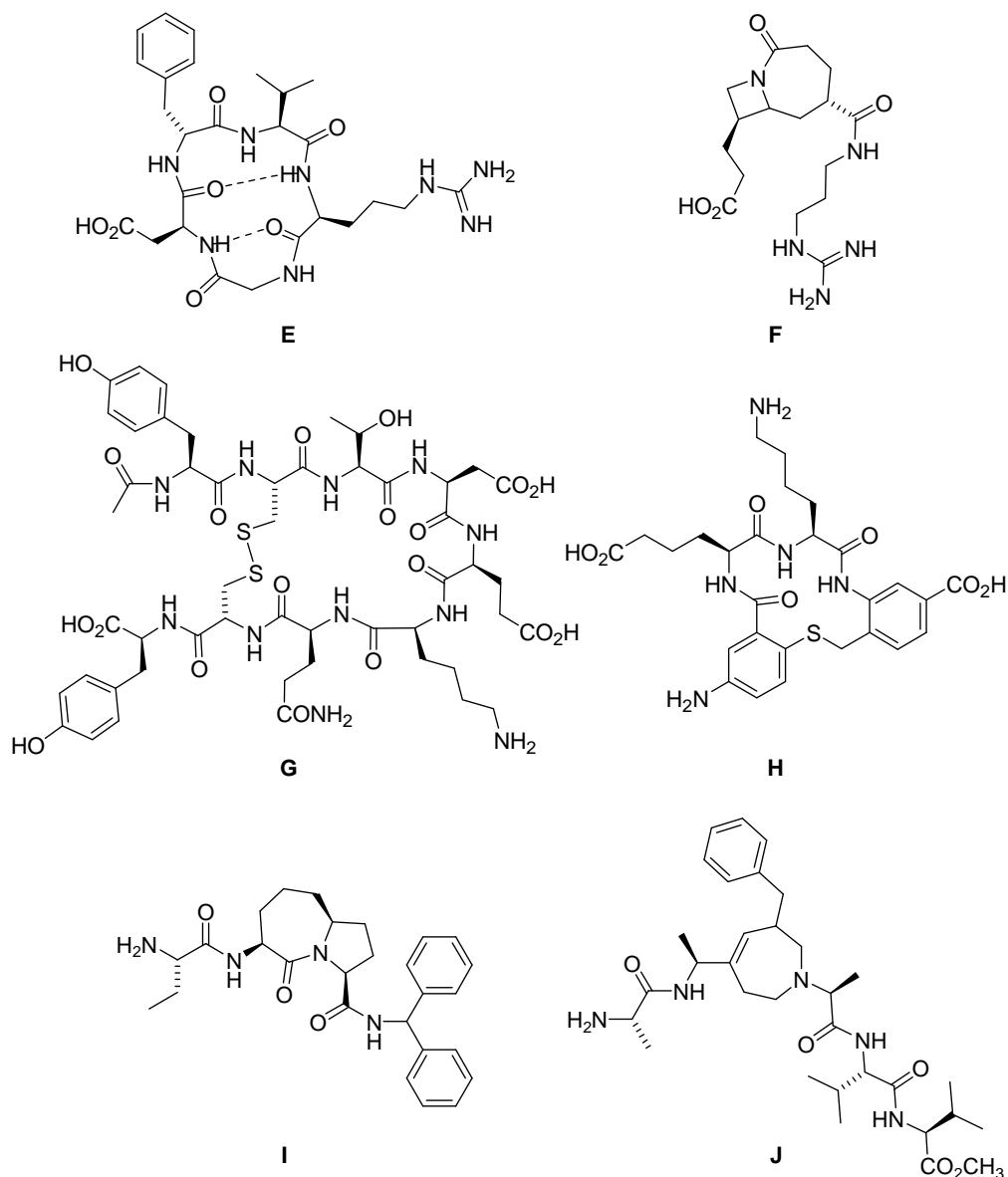


Figura 2

### **Objetivos generales.**

Los objetivos generales de esta Tesis se encuadran dentro del campo de moduladores de las interacciones péptido-proteína y/o proteína-proteína. En concreto se pretende:

1. Evaluar la capacidad inductora de giros inversos de una serie de derivados de 2-alkil-2-carboxiazetidinas cuando se incorporan en péptidos pequeños, para determinar su potencial en la búsqueda de moduladores de las mencionadas interacciones.
2. Diseñar, sintetizar y estudiar análogos conformacionalmente restringidos de “hot spots” importantes para la interacción entre el factor de crecimiento nervioso (NGF) o el factor de crecimiento derivado de cerebro (BDNF) y sus receptores.





## **CAPÍTULO 1**

### **MODELOS TETRAPEPTÍDICOS QUE INCORPORAN DERIVADOS DE 2-CARBOXIAZETIDINA Y PROLINA EN POSICIÓN $i+1$ E $i+2$ .**

---



## 1.1. Introducción.

Los giros inversos constituyen una clase importante de estructuras secundarias peptídicas, que se definen como regiones donde se produce la inversión de la dirección de la cadena peptídica y los aminoácidos implicados son como máximo seis<sup>53</sup>. Estos giros juegan un papel importante tanto desde el punto de vista estructural, como funcional. Así, permiten que las proteínas se plieguen en estructuras globulares al aproximar en el inicio del plegamiento zonas distantes de la cadena<sup>54,55</sup>. Además, dada su abundancia y frecuente localización en la superficie proteica<sup>56</sup>, a menudo se encuentran implicados en procesos de reconocimiento molecular<sup>54,57-59</sup>, como las uniones péptido-receptor, la determinación antigénica e interacciones proteína-proteína, por lo que proporcionan información muy útil a la hora de definir estructuras para el diseño de nuevas moléculas que actúen como fármacos, pesticidas y antígenos<sup>53</sup>.

Se han descrito diferentes tipos de giros en función del número de residuos implicados en ellos. En este sentido, existen los giros  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\alpha$  y  $\pi$ , en los que participan dos, tres, cuatro, cinco y seis residuos de aminoácidos, respectivamente<sup>53,60</sup>. En general, estos giros se encuentran estabilizados por un enlace de hidrógeno intramolecular. Los giros más relevantes, por su abundancia e importancia biológica, son los giros  $\beta$  y  $\gamma$ .

Los giros  $\beta$  son el elemento de estructura secundaria no repetitiva más común en proteínas. Un giro  $\beta$  se ha definido, en sentido amplio, como un pseudociclo de diez eslabones formado por una secuencia tetrapeptídica, no perteneciente a una estructura helicoidal, donde la distancia entre los carbonos  $\alpha$  del primer y cuarto residuo ( $\alpha C^i - \alpha C^{i+3}$ ) es inferior a 7 Å<sup>61,62</sup>. Con frecuencia estos giros se encuentran estabilizados por un enlace de hidrógeno intramolecular entre el oxígeno del carbonilo del primer residuo (i) y el NH del cuarto (i+3)<sup>60</sup>. Si el enlace de hidrógeno no está presente se denominan giros  $\beta$  abiertos. Lewis *et al.* en 1973, en un estudio de giros presentes en proteínas, observaron que un 25 % de los giros  $\beta$  estudiados no poseían enlace de hidrógeno intramolecular<sup>63</sup>.

Los giros inversos fueron identificados por primera vez a partir de un análisis conformacional de Venkatachalam (1968)<sup>64</sup>, que definió, en base a los valores de los ángulos diedros  $\phi$  y  $\psi$  de los residuos i+1 e i+2 del giro<sup>63-65</sup>, tres tipos generales de giros  $\beta$  (I, II y III), junto con sus imágenes especulares (I', II', III'). El aumento en el número de estructuras tridimensionales de proteínas conocidas, permitió a Lewis *et al.* incrementar,

en 1973, el número de tipos de giros  $\beta$  a  $10^{63}$ . A principio de los 80, Richardson redujo este número a siete, en concreto los tipos I, I', II, II', VIa, VIb, IV, donde las primeras seis categorías están basadas en los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  y el tipo IV es una categoría miscelánea<sup>65</sup>. De este modo, Richardson eliminó la conformación de tipo III al tener valores de los ángulos diedros  $\phi$  y  $\psi$  equivalentes a los de una hélice  $3_{10}$ . Finalmente, en 1994, basándose en la clasificación de Richardson, y analizando el mayor número de estructuras de Rayos X de proteínas disponible, Hutchinson y Thornton realizaron una nueva clasificación de giros  $\beta$ <sup>66</sup>, compuesta por nueve tipos diferentes (Figura 3)<sup>54</sup>. Para clasificar una secuencia peptídica como perteneciente a un determinado tipo de giro se comparan los valores de sus ángulos diedros  $\phi_{i+1}$ ,  $\psi_{i+1}$ ,  $\phi_{i+2}$ ,  $\psi_{i+2}$  con los valores ideales<sup>63-65</sup>, permitiendo variaciones de  $\pm 30^\circ$ , con la flexibilidad añadida de una desviación de  $\pm 45^\circ$  en uno de los ángulos<sup>54,67</sup>.

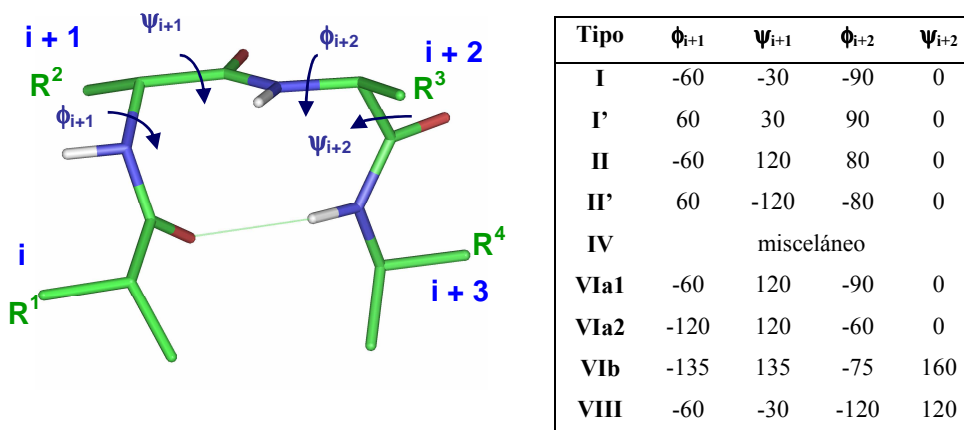


Figura 3. Estructura y principales tipos de giros  $\beta$ .

Otro parámetro estructural importante de los giros  $\beta$  lo constituye el ángulo pseudotorsional  $\tau$ <sup>68</sup>, definido como el ángulo pseudodiedro de la secuencia atómica  $\alpha C^i - \alpha C^{i+1} - \alpha C^{i+2} - \alpha C^{i+3}$ , que describe la angularidad del esqueleto y aporta información acerca de la orientación relativa de las cadenas peptídicas que entran y salen del giro. El valor de  $\tau$  para un giro  $\beta$  debe estar comprendido entre  $90$  y  $-90^\circ$ .

Se han realizado diferentes estudios para analizar las preferencias de cada una de las posiciones del giro por determinados aminoácidos<sup>66,69,70</sup>. En general, se ha observado una preferencia por residuos hidrofílicos frente a hidrofóbicos, que se puede racionalizar

por la tendencia de los giros a localizarse en la superficie del péptido o proteína, expuesta al disolvente. Adicionalmente, se observan preferencias por los aminoácidos glicina, prolina, asparagina y ácido aspártico, aunque varía la tendencia según la posición en la secuencia tetrapeptídica. En este sentido, cabe señalar la alta presencia del aminoácido Pro en posición  $i+1$  de giros  $\beta$  de tipos I y II. La inherente restricción del ángulo  $\phi$  en torno a los  $-60^\circ$  en la prolina se corresponde al valor ideal del ángulo  $\phi_{i+1}$  para ambos tipos de giro<sup>67</sup>. Por otra parte, se ha observado que en los giros de tipo VI el residuo en posición  $i+2$  es Pro, y además el enlace amida precedente Xaa-Pro se encuentra en disposición *cis*.

La segunda gran familia dentro de los giros inversos la constituye los giros  $\gamma$  (aproximadamente el 30 % del total de giros)<sup>62,70</sup>. Estos giros están formados por tres residuos consecutivos formando un pseudociclo de siete miembros, estabilizados en general por la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el grupo carbonilo del primer residuo ( $i$ ) y el NH del tercero ( $i+2$ )<sup>70</sup>. Los giros  $\gamma$  se han clasificado por Nemethy y Printz como clásicos e inversos en función de los ángulos diedros  $\phi$  y  $\psi$  del residuo central del giro, estando los ángulos diedros de la cadena peptídica relacionados por simetría especular (Figura 4)<sup>54,60,62,71,72</sup>. Los giros  $\gamma$  clásicos son poco frecuentes en proteínas, y dan lugar a una inversión ( $180^\circ$ ) de la dirección de la cadena polipeptídica, encontrándose a menudo en el loop final de horquillas  $\beta$ <sup>73</sup>. Por el contrario, aunque el giro  $\gamma$  inverso provoca una inclinación en la cadena peptídica, rara vez se encuentra en horquillas  $\beta$  o en una posición que implique la reversión de la dirección de la cadena peptídica. Dentro de los giros  $\gamma$  inversos, su localización depende de la fortaleza del enlace de hidrógeno. Así, si éste es débil se suelen localizar en medio de hebras  $\beta$ , mientras que si el enlace de hidrógeno es más fuerte se sitúan al final de hélices  $\alpha$ , de hebras  $\beta$ , o adyacentes a ciertos loops<sup>74</sup>.

Un análisis de las preferencias de los aminoácidos por las diferentes posiciones de giros  $\gamma$  ha mostrado un comportamiento diferente en función del tipo de giro. Así, por ejemplo, en los giros  $\gamma$  clásicos existe una marcada preferencia por el residuo de Gly en posición  $i+1$ , mientras que en los giros  $\gamma$  inversos la frecuencia es mayor para los residuos de Asp, Asn y Pro<sup>70</sup>. En este sentido, señalar que en los giros  $\gamma$  clásicos estudiados el residuo de Pro se sitúa exclusivamente en la posición  $i$ , mientras que en los giros  $\gamma$  inversos la Pro se puede localizar en posición  $i$  o  $i+1$ .

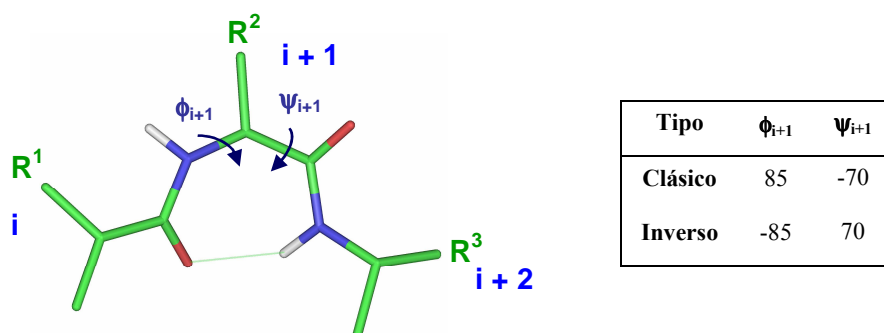


Figura 4. Estructura y principales tipos de giros  $\gamma$ .

Como ya se he indicado, una de las aproximaciones en la modulación de interacciones péptido-proteína o proteína-proteína es la búsqueda de pequeñas moléculas sintéticas capaces de mimetizar los elementos de la estructura secundaria peptídica claves para la interacción. En este sentido, los giros inversos son una diana atractiva ya que se encuentran implicados en interacciones de relevancia terapéutica y presentan la ventaja de su simplicidad estructural. Sin embargo, el uso de péptidos con fines terapéuticos presenta una serie de limitaciones debido a las propiedades farmacocinéticas adversas de los péptidos, su rápida degradación por peptidasas en condiciones fisiológicas, su escasa biodisponibilidad oral y su rápida excreción. Adicionalmente, los péptidos lineales pequeños tienen en general gran flexibilidad conformacional, lo que puede conllevar un aumento de la capacidad de unión a diversos receptores y por tanto una baja especificidad de acción, con posibles efectos secundarios adversos<sup>75</sup>. Una forma de subsanar estos inconvenientes la constituye el uso de miméticos o inductores de estas estructuras secundarias, de forma que limiten el número de conformaciones accesibles del péptido y se potencie una mejor interacción con su diana, así como una mayor selectividad. Idealmente, un mimético debería cumplir una serie de requisitos. En primer lugar, su estructura tridimensional debe reproducir la topografía del giro a mimetizar. Además, y dada la importancia de las cadenas laterales de los aminoácidos en el reconocimiento por los receptores, es esencial que éstas se puedan introducir en las posiciones deseadas con la estereoquímica correcta. Por otra parte, el inductor/mimético debe poseer terminaciones amino y carboxilato adecuadas para su inserción en cualquier cadena

peptídica. Finalmente, sería deseable que la ruta sintética hasta el mimético fuera corta y eficiente.

El potencial interés terapéutico de los análogos de giros inversos se ha traducido en numerosos esfuerzos dirigidos hacia la búsqueda de estructuras capaces de mimetizar o inducir su topografía. Así, se han reemplazado residuos de aminoácidos naturales por otros no proteinogénicos que sean capaces de fijar uno o más de sus ángulos diedros, restringiendo así la flexibilidad conformacional de péptidos pequeños, de forma que puedan adoptar la disposición tridimensional de los giros. Otra estrategia consiste en la sustitución de los residuos centrales de los giros por esqueletos rígidos que simulen su topografía, tales como sistemas aromáticos, bicíclicos o espirocíclicos. Alternativamente, se ha reemplazado el enlace de hidrógeno intramolecular del giro por enlaces covalentes. Estas modificaciones, que pretenden conducir a un esqueleto peptídico con capacidad para reproducir la estructura del giro, suelen además proporcionar mayor estabilidad metabólica a los derivados peptídicos.

Los miméticos de giros  $\beta$  se han clasificado en dos grupos, miméticos internos y externos, de acuerdo con la situación de los átomos del mimético en relación al giro. Los miméticos internos son ciclopéptidos que, en general, se basan en la sustitución del enlace de hidrógeno característico de estos giros por un enlace covalente, poniendo énfasis en la situación de las cadenas laterales. Las estructuras pioneras de Kahn<sup>76</sup> (Figura 5, **A**) y Olson<sup>77</sup> (Figura 5, **B**) son dos ejemplos representativos de este tipo de miméticos. En ambos casos se ha sustituido el pseudociclo de 10 eslabones formado por el esqueleto peptídico del giro  $\beta$  y el enlace de hidrógeno, por lactamas de 10 y 9 miembros, respectivamente. Más recientemente se ha descrito el esqueleto **C** (Figura 5), con un anillo de 10 eslabones, que se ha incorporado en sustitución de los cuatro primeros residuos de Leu-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu)<sup>78</sup>.

En lo que respecta a los miméticos de giros  $\beta$  externos, a menudo se construyen sustituyendo los residuos centrales del giro ( $i+1$  e  $i+2$ ) por esqueletos rígidos, reduciendo así la flexibilidad conformacional del péptido, empleándose fundamentalmente para orientar adecuadamente los extremos *N*- y *C*-terminales de forma que se produzca la inversión de la cadena peptídica. En este sentido, es de destacar el uso de lactamas para fijar conformaciones de giros inversos, idea iniciada por Freidinger en el año 1980 con la incorporación como mimético de giro  $\beta$  de tipo II' de la lactama **D**<sub>1</sub> (Figura 5) en la LH-RH (Hormona liberadora de la hormona luteinizante)<sup>79,80</sup>. El desarrollo posterior de

esta idea ha dado lugar a la preparación de diferentes tipos de lactamas, entre las que cabe señalar el derivado de tiazolidina BTM (“Beta Turn Mimetic”) desarrollado por Nagai (Figura 5, **E<sub>2</sub>**), que se ha comportado como un mimético de giro  $\beta$  tipo II’ tras su incorporación en Gramacidina S y en otros péptidos de interés biológico<sup>81,82</sup>. Los buenos resultados obtenidos con estas lactamas han conducido a la búsqueda de otros esqueletos lactámicos mono y policíclicos, como las espirolactamas tricíclicas **F<sub>1</sub>**<sup>83</sup> y **F<sub>2</sub>**<sup>84</sup> (Figura 5), el derivado de indolizinoindol IBTM (Figura 5, **G**)<sup>45,85</sup>, y más recientemente el derivado de benzodiazepina **H**<sup>86</sup>.

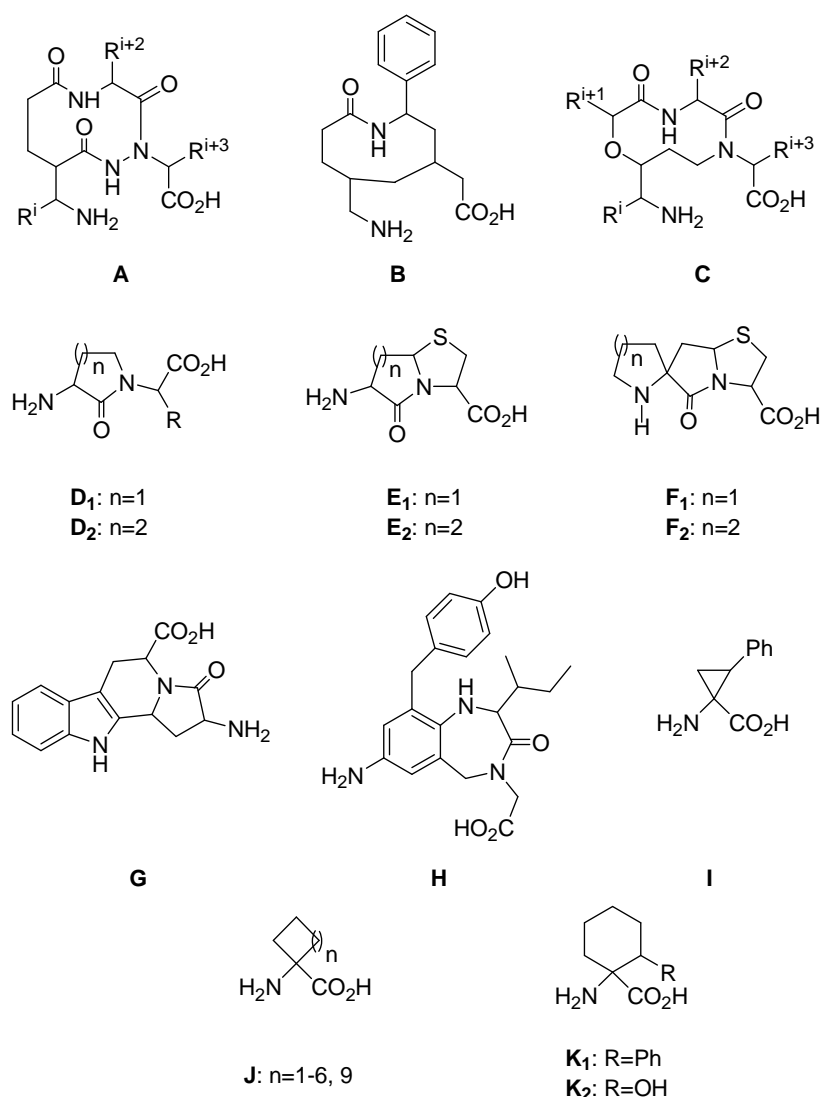


Figura 5. Miméticos e inductores de giros  $\beta$ .



Por otra parte, también se han descrito residuos de aminoácidos que, incorporados en la cadena peptídica, son capaces de inducirla a adoptar un giro  $\beta$ . Entre ellos cabe destacar los aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos capaces de estabilizar conformaciones secundarias peptídicas en péptidos pequeños, principalmente derivados de ácidos 1-aminocicloalquilcarboxílicos (ciclación  $C^\alpha-C^\beta$ )<sup>87</sup>. Algunos ejemplos representativos los constituyen los derivados **I**<sup>88</sup>, **J**<sup>89</sup> y **K**<sup>90,91</sup> que se encuentran recogidos en la Figura 5. Es de señalar que algunos de estos esqueletos permiten la incorporación de cadenas laterales de aminoácidos, como en el caso de los derivados **I** y **K**<sub>1</sub>, que se pueden considerar análogos conformacionalmente restringidos de Phe, o el análogo de Ser **K**<sub>2</sub>.

En cuanto a los giros  $\gamma$ , el número de estructuras descritas para mimetizar o inducir estos giros es menor que para los giros  $\beta$ . Existen ejemplos de estabilización de giro  $\gamma$  mediante ciclaciones, entre ellos el péptido cíclico mediante enlaces disulfuro **L** (Figura 6)<sup>92</sup>. Sin embargo, la mayoría de los miméticos descritos hasta la fecha se basan en la incorporación de restricciones conformacionales mediante esqueletos heterocíclicos más pequeños. En este sentido, cabe señalar que al igual que en los miméticos de giros  $\beta$ , el uso de lactamas mono y bicíclicas ocupa un lugar destacado en la búsqueda de miméticos de giros  $\gamma$ , en particular, el esqueleto de diazepina. Así, la estructura **M** (Figura 6), en la que el enlace de hidrógeno característico de estos giros se ha sustituido por un puente etileno, se comportó como mimético de giro  $\gamma$  cuando se incorporó a la secuencia RGD, fragmento clave del fibrinógeno en la unión a sus receptores<sup>93</sup>. Posteriormente, se ha reemplazado el doble enlace de **M** por un enlace retroamida, lo que conlleva una mayor accesibilidad sintética<sup>94</sup>, o se han generado sistemas bicíclicos con esqueleto de benzodiazepina, que pueden incorporar sustituyentes en posiciones 7<sup>95</sup> (Figura 6, **N**) u 8<sup>96</sup> del anillo. El interés en los derivados de azepinona como miméticos de giros  $\gamma$ , ha llevado recientemente a la construcción de una quimioteca de miméticos de estos giros basados en el esqueleto de 1,4-diazepin-5-ona **O**<sup>97</sup>. Otros ejemplos de miméticos de tipo lactámico son los derivados de isoquinolinona **P**<sup>98</sup>, o los esqueletos monocíclicos **Q-S**<sup>59,99,100</sup>. En particular, cabe destacar que algunos análogos peptídicos de angiotensina II, que contienen el esqueleto **S**, son capaces de interaccionar con los receptores de angiotensina II<sup>100</sup>.

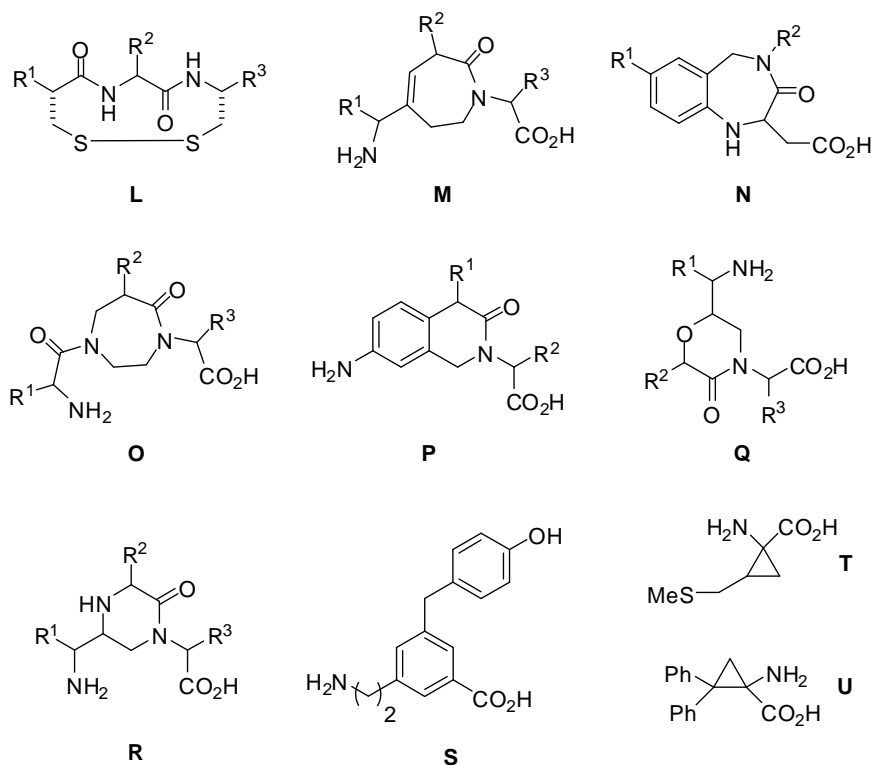


Figura 6. Miméticos e inductores de giros  $\gamma$ .

Por otra parte, también se han descrito aminoácidos conformacionalmente restringidos que son capaces de inducir giros  $\gamma$ , como los derivados de ciclopropano **T**<sup>101</sup> y **U**<sup>102</sup>. En este sentido, la incorporación del esqueleto **U** en un modelo tetrapeptídico sencillo constituye el primer ejemplo descrito de la existencia de dos giros  $\gamma$  consecutivos en estado cristalino en un péptido lineal.

## 1.2. Antecedentes inmediatos.

El interés general despertado por los miméticos de giros inversos motivó a nuestro grupo a iniciar una línea de investigación encaminada a la obtención de esqueletos heterocíclicos capaces de mimetizar o inducir este tipo de estructuras. En concreto, se ha descrito el esqueleto de indolizinoindol (IBTM, Figura 5, **G**) como un mimético de giros  $\beta$  tipo II o II<sup>45,85</sup>, en función de la estereoquímica del heterociclo, y los derivados de 2-oxopiperazina (Figura 6, **R**) como estructuras capaces de mimetizar giros  $\gamma$ <sup>99</sup>.

Más recientemente, se ha puesto a punto un método novedoso y versátil para la obtención de 2-alkil-2-carboxiazetidinas a partir de aminoácidos y su transformación posterior en las correspondientes azetidinas, como se indica en el Figura 7<sup>103-109</sup>. Estas azetidinas permiten incorporar, en principio, toda la variedad de cadenas laterales de aminoácidos en el carbono 2 ( $R^1$ ). Además, poseen el ángulo diedro  $\phi$  restringido en torno a los 70 ó  $-70^\circ$ , dependiendo de la configuración absoluta en el carbono asimétrico<sup>105,106</sup>. Este valor es similar a los reportados para los ángulos  $\phi$  de los residuos centrales de los principales tipos de giros  $\beta$  y  $\gamma$ . Por tanto, se podrían considerar, *a priori*, como candidatos prometedores para la inducción de giros inversos. Sería de esperar que la inserción de estas azetidinas en cadenas peptídicas indujera a éstas a adoptar conformaciones definidas, además de permitir la incorporación de la cadena lateral del residuo al que sustituyen. Por lo tanto, estos derivados de azetidina podrían ser herramientas útiles para estudiar la participación de giros inversos en la conformación bioactiva de péptidos, a través de la sustitución secuencial de cada residuo del péptido por la azetidina correspondiente.

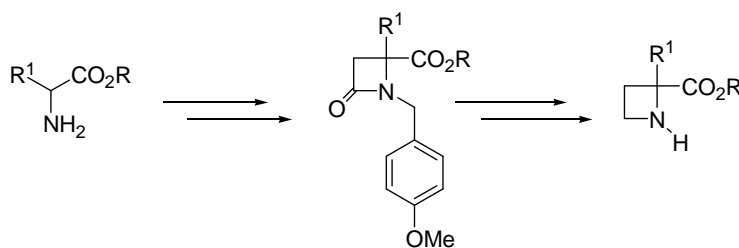


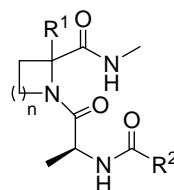
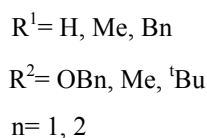
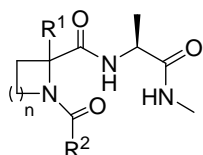
Figura 7



### 1.3. Objetivos.

En el presente capítulo se pretenden abordar dos objetivos fundamentales:

1. Evaluar la capacidad inductora de giros inversos de los derivados de 2-alkil-2-carboxiazetidinas tras su inserción en péptidos pequeños y compararla a la de los correspondientes análogos de prolina. Para este fin se eligieron derivados dipeptídicos con un grupo acilo o aciloxi en posición *N*-terminal y un agrupamiento *N*-metilcarboxamida en *C*-terminal, como modelos tetrapeptídicos sencillos. Los derivados de azetidina o prolina se incorporarán en posición *i*+1 o *i*+2, con objeto de estudiar la influencia de su situación en la cadena peptídica sobre la conformación global de los péptidos.



2. Estudiar la influencia de los sustituyentes en el grupo amino *N*-terminal ( $R^2$ ) y en el carbono 2 del anillo de azetidina ( $R^1$ ) sobre la capacidad para inducir giros inversos de las 2-alkil-2-carboxiazetidinas.



#### 1.4. Modelos tetrapeptídicos que incorporan derivados de 2-carboxiazetidina y prolina en posición i+1 (R-CO-Xaa-Ala-NHMe).

##### 1.4.1. Síntesis.

La preparación de los derivados dipeptídicos diseñados como modelos tetrapeptídicos sencillos se realizó siguiendo procedimientos clásicos de síntesis de péptidos en disolución, a partir de aminoácidos de partida convenientemente protegidos (Figura 8). En este sentido, fue necesaria la preparación previa de los derivados de aminoácidos no comerciales Z- $\alpha$ -MePro-OH (**1b**), Z-Aza-OH<sup>a</sup> [(*R,S*)-**3b**], Z-Azf-OH [(*R,S*)-**3c**].

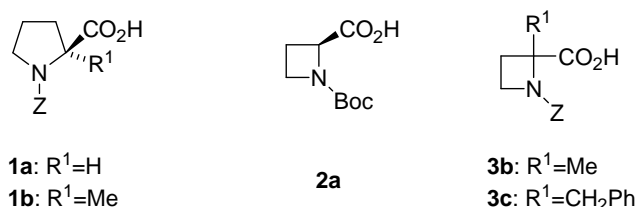
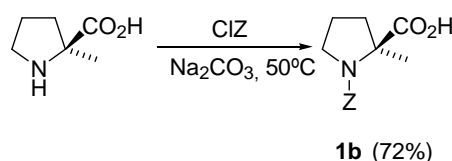


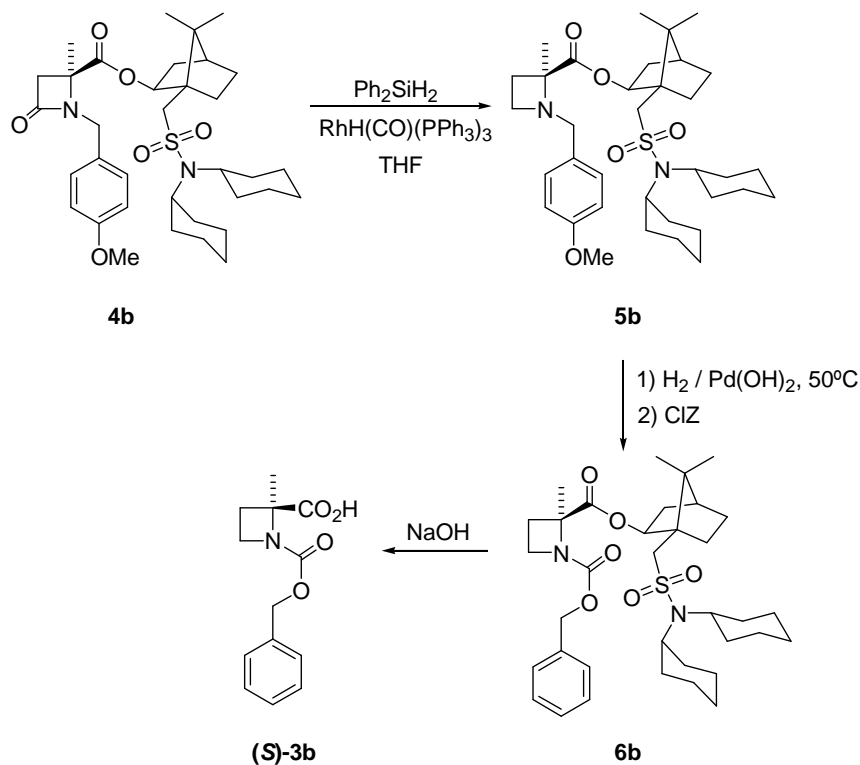
Figura 8. Derivados de Pro y Azx necesarios para la síntesis de los péptidos modelo.

La preparación de Z- $\alpha$ -MePro-OH requirió tan solo de un paso de reacción a partir del producto comercial H- $\alpha$ -MePro-OH, como se indica en el Esquema 1. La acilación con cloruro de benciloxicarbonilo en medio acuoso condujo al aminoácido Z-protégido **1b** con buen rendimiento tras 9 días de reacción.



Esquema 1

<sup>a</sup> Las dos primeras letras (Az) indican el anillo de azetidina, mientras que la tercera letra se corresponde con la notación de una letra del aminoácido correspondiente: Azg= azetidina derivada de Gly, Aza= azetidina derivada de Ala, Azf= azetidina derivada de Phe, Azx= azetidina derivada de cualquier aminoácido.



Esquema 2

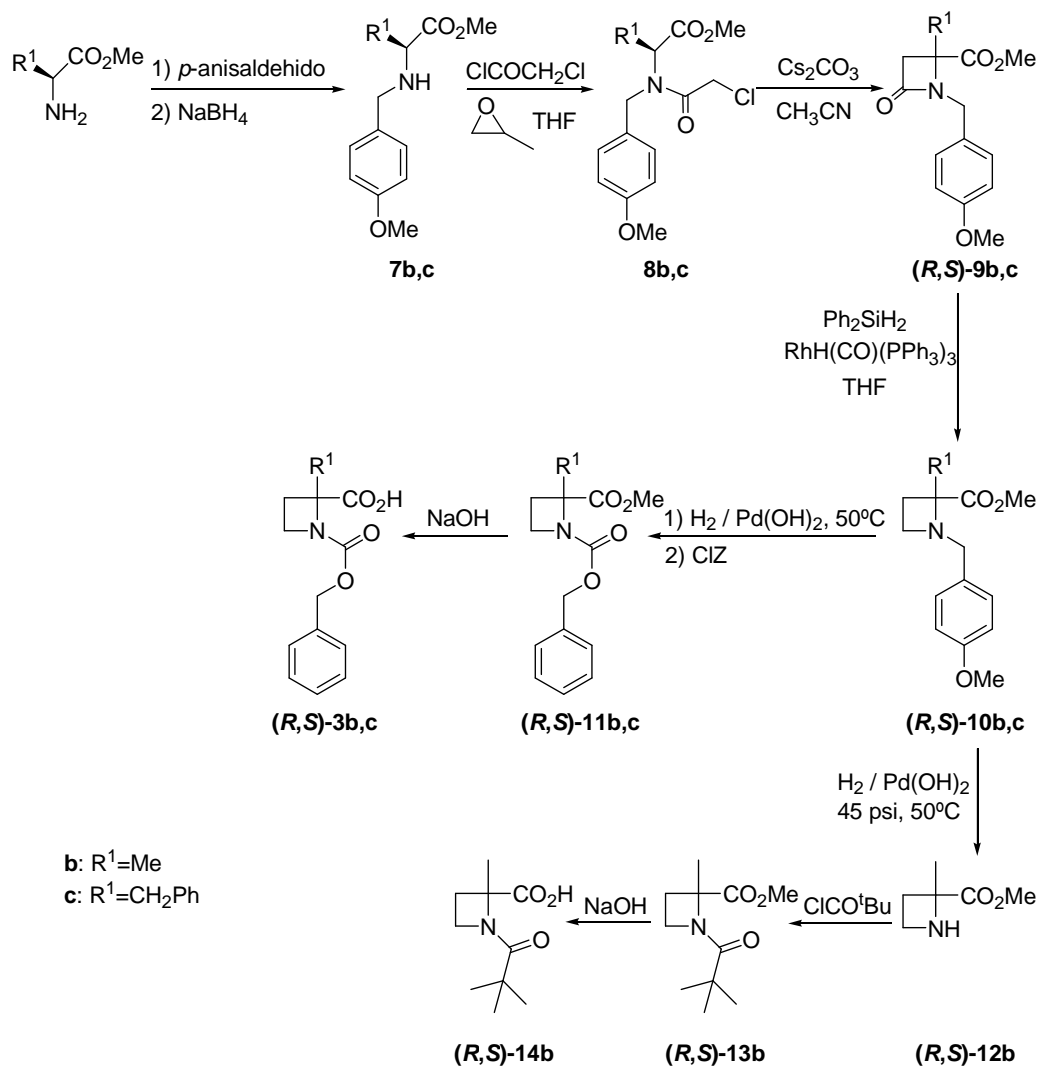
Los derivados de azetidina se prepararon siguiendo rutas sintéticas previamente descritas en nuestro grupo<sup>103-107,110</sup>. En primera instancia, se abordó la síntesis del derivado de azetidina **(S)-3b** a partir del compuesto **4b** (Esquema 2). La  $\beta$ -lactama **4b** de configuración 4*S* se preparó siguiendo una ruta enantioselectiva basada en la utilización de un auxiliar quirral, (+)-10-(*N,N*-d ciclohexilsulfamoil)isoborneol<sup>105</sup>. La reducción de la azetidinona **4b** condujo a la azetidina **5b** (42 % de rendimiento), en la que desaparece la señal correspondiente al carbono carbonílico del anillo de azetidinona en el espectro de <sup>13</sup>C RMN, y aparece en su lugar un carbono alifático en torno a 50 ppm (4-C), a la vez que el carbono 3-C aparece más apantallado (~26 ppm frente a 42 ppm en la  $\beta$ -lactama de partida). La hidrogenación catalítica del grupo *p*-(metoxi)bencilo del derivado **5b**, y la subsiguiente reacción con cloroformiato de bencilo dio lugar a la azetidina **6b** (49 %), protegida en el extremo *N*-terminal con el grupo benciloxicarbonilo. En el espectro de <sup>1</sup>H RMN de **6b** se observó la desaparición del singlete del grupo metoxilo junto con la



aparición en  $^{13}\text{C}$  RMN de un nuevo carbono cuaternario en torno a 155 ppm, correspondiente al carbonilo del grupo Z, además de las señales de carbono aromático y la correspondiente señal del carbono del grupo metileno (en torno a 67 ppm). A continuación se llevó a cabo la saponificación del éster derivado de isoborneol **6b**, conduciendo al compuesto Z-(S)-Aza-OH [(S)-**3b**] con un 82 % de rendimiento. Aunque esta ruta permitió obtener un único diastereoisómero del derivado **3b**, debido a los bajos rendimientos globales se decidió abordar una ruta alternativa no enantioselectiva, e intentar separar los enantiómeros de las azetidinas mediante la preparación y subsiguiente separación de derivados diastereisoméricos que incorporan auxiliares quirales temporales.

Los derivados de Z-Azx-OH (**R,S**)-**3b,c** se prepararon siguiendo un procedimiento sintético puesto a punto por nuestro grupo de trabajo<sup>103,106</sup>. El primer paso de la secuencia sintética fue la preparación de los N-parametoxibencil derivados **7b,c** a partir de H-Ala-OMe o H-Phe-OMe mediante un proceso de aminación reductora, recogido en el Esquema 3. La reacción de estos derivados con cloruro de cloroacetilo, en presencia de óxido de propileno como captador de hidrácido, dio lugar a los derivados cloroacetilados **8b,c** (96 %). Es de resaltar que en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN de estos compuestos, los protones en posición  $\alpha$  y N-CH<sub>2</sub> aparecen notablemente desapantallados en comparación con esos mismos protones en los derivados **7b,c**. Además, se observan 2 dobletes a 4.09 y 4.01 ppm (compuesto **8b**) y un multiplete a 4.01 ppm (derivado **8c**) correspondientes a los protones del grupo CH<sub>2</sub>-Cl. En sus espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN aparece un nuevo carbono carbonílico en torno a 167 ppm, correspondiente al del grupo amida generado. La ciclación intramolecular de los derivados **8b,c** utilizando Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como base y CH<sub>3</sub>CN como disolvente condujo a las  $\beta$ -lactamas (**R,S**)-**9b,c** con rendimientos de moderados a buenos. La desaparición del protón  $\alpha$ -Ala [(**R,S**)-**9b**] o  $\alpha$ -Phe [(**R,S**)-**9c**] en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN, junto a la aparición de una señal de carbono cuaternario en torno a 60 ppm en el de  $^{13}\text{C}$  RMN, fue indicativo de la formación del anillo de azetidinona. Es de señalar que aunque en este proceso se parte de un aminoácido ópticamente activo, la formación del anillo de  $\beta$ -lactama transcurre a través de un intermedio de tipo enolato plano, lo que conduciría a la formación de los derivados (**R,S**)-**9b,c** como mezcla racémica. Sin embargo, para aminoácidos con cadena lateral ramificada, la ciclación debe transcurrir a través de un enolato plano con quiralidad axial, de acuerdo con el concepto de memoria de quiralidad, lo que conlleva moderada enantioselectividad hacia el isómero

$4S^{103,104,106}$ . En el caso particular de la ciclación del derivado **8c**, la selectividad observada hacia la  $\beta$ -lactama **9c** de configuración  $4S$ , frente a la  $4R$ , fue de 3.5:1.

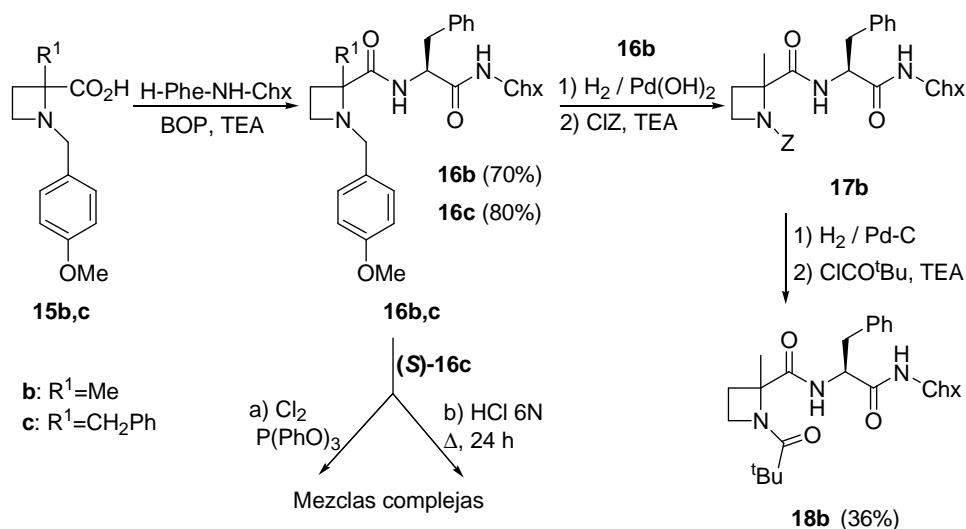


Esquema 3

Una vez preparadas las 2-azetidinonas **(R,S)-9b,c**, el siguiente paso de la secuencia fue su reducción selectiva utilizando  $\text{Ph}_2\text{SiH}_2$  y  $\text{RhH(CO)(PPh}_3)_3$  como catalizador<sup>105</sup>, para dar lugar a los derivados de azetidina **(R,S)-10b,c** (63-67 %). La eliminación del grupo *p*-(metoxi)bencilo de los compuestos **(R,S)-10b,c** mediante

hidrogenación, utilizando  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  como catalizador y HCl para evitar su envenenamiento, y la posterior protección del NH libre con un grupo Z dio lugar a las azetidinas **(R,S)-11b,c**. Finalmente, la saponificación de éstas condujo a los productos buscados Z-(R,S)-Azx-OH [**(R,S)-3b,c**] con alto rendimiento.

Para preparar el *N*-pivaloil derivado **(R,S)-14b**, en primer lugar se llevó a cabo la hidrogenación catalítica del grupo *p*-(metoxi)bencilo del compuesto **(R,S)-10b** seguida de *N*-acilación del nitrógeno del anillo de azetidina del derivado **(R,S)-12b**, para dar lugar a Piv-(R,S)-Aza-OMe [**(R,S)-13b**]. En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN de **(R,S)-13b** se observa la desaparición de los protones aromáticos, así como los del resto metoxilo del grupo *p*-(metoxi)bencilo de **(R,S)-10b**, conjuntamente con la aparición de un singlete que integra para nueve protones a 1.18 ppm, correspondiente a los metilos del resto de pivaloil. Además, en los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN aparecen dos nuevas señales de carbono cuaternario a 177.7 y 38.3 ppm, atribuibles al carbonilo y carbono cuaternario del grupo pivaloil, respectivamente. Finalmente, la saponificación de **(R,S)-13b** condujo a Piv-(R,S)-Aza-OH [**(R,S)-14b**].

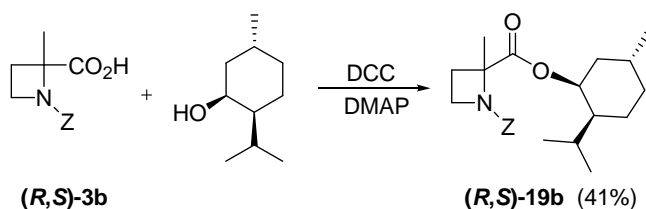


Esquema 4

Con objeto de intentar resolver las mezclas enantioméricas de los derivados de azetidina **(R,S)-3b,c**, se las hizo reaccionar con moléculas quirales para formar las correspondientes parejas de diastereoisómeros, que pudieran separarse

cromatográficamente. En primer lugar, se acoplaron las azetidinas **(R,S)-15b,c** [resultantes de la saponificación de **(R,S)-10b,c**] con H-Phe-NHChx (Esquema 4)<sup>111-114</sup>. Desafortunadamente, sólo fue posible separar la pareja de diastereoisómeros del derivado **(R,S)-16c**. Con objeto de separar los diastereoisómeros de **(R,S)-16b** se substituyó el resto de *p*-(metoxi)bencilo en posición *N*-terminal por un grupo benciloxicarbonilo o pivaloilo. Sin embargo, tan sólo en el caso del derivado de pivaloilo **(R,S)-18b** fue posible el aislamiento de los dos diastereoisómeros. Una vez separados los diastereoisómeros de los derivados de Azx, se intentó la eliminación del agente de resolución, pero tanto el burbujeo de Cl<sub>2</sub> a una disolución de **(S)-16c** y posterior adición de P(PhO)<sub>3</sub><sup>115</sup>, como su digestión con HCl 6N a reflujo durante 1 día, no condujeron a la escisión de los enlaces amida, sino a mezclas complejas de productos.

Teniendo en cuenta los problemas surgidos en la ruptura del enlace peptídico, se decidió utilizar una estrategia alternativa para la separación de los enantiómeros de Azx, basada en el empleo de auxiliares quirales de fácil desprotección, 2,10-canforsultama y (+)-10-*N,N*-(díciclohexilsulfamoil)isoborneol<sup>116-119</sup>. Con este fin, se procedió a la incorporación de estos auxiliares quirales en las azetidinas *Z*-(*R,S*)-Aza-OH [**(R,S)-3b**] y Pmb-(*R,S*)-Aza-OH [**(R,S)-15b**], utilizando cloroformiato de isobutilo como agente activante, o generando *a priori* los cloruros<sup>120-127</sup> o fluoruros de ácido<sup>128,129</sup>. Desafortunadamente, tan solo se consiguieron trazas de los productos buscados en la reacción de Pmb-(*R,S*)-Aza-OH [**(R,S)-15b**] con 2,10-canforsultama. Por otra parte, el uso de (+)-mentol como auxiliar quiral permitió la obtención del éster **(R,S)-19b** mediante reacción con *Z*-(*R,S*)-Aza-OH [**(R,S)-3b**], utilizando DCC como agente de acoplamiento (Esquema 5). Desafortunadamente no fue posible la separación cromatográfica de la pareja de diastereoisómeros.



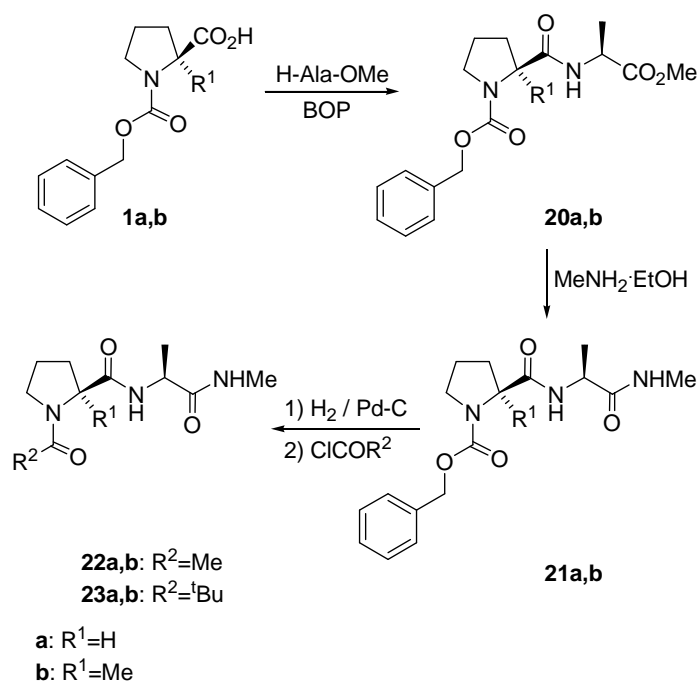
Esquema 5

Ante la falta de un proceso efectivo para la resolución de los enantiómeros de los derivados de Azx, se recurrió a una ruta sintética alternativa descrita por Kawabata y colaboradores para la formación de azetidinas ópticamente activas a partir de los correspondientes aminoácidos mediante tres pasos de reacción en “one pot”<sup>130</sup>. En nuestras manos, los distintos intentos de reproducir este procedimiento, partiendo inicialmente de derivados de alanina y fenilalanina, resultaron infructuosos.

En resumen, se han ensayado distintas estrategias para resolver los enantiómeros de las azetidinas (**R,S**)-**3b,c**, pero todas resultaron infructuosas. Por lo tanto, se decidió incorporar estas azetidinas en los modelos tetrapeptídicos e intentar la separación de diastereoisómeros en pasos posteriores de la secuencia sintética. De esta forma, y una vez preparados los aminoácidos R<sup>2</sup>CO-Xaa-OH convenientemente protegidos, se procedió a la síntesis de los correspondientes derivados dipeptídicos, para lo que se siguieron las secuencias sintéticas indicadas en los Esquemas 6-9.

El primer paso para la preparación de los dipéptidos derivados de Pro **22** y **23** (Esquema 6) implicó el acoplamiento peptídico entre los aminoácidos **1a,b** y H-Ala-OMe, utilizando BOP como agente de acoplamiento, para dar lugar a los dipéptidos **20a,b** con altos rendimientos (en torno al 80 %). El siguiente paso de la secuencia sintética lo constituyó la formación de los correspondientes derivados con un agrupamiento metilamino en posición C-terminal. La transformación de los ésteres **20a,b** en sus correspondientes amidas utilizando MeNH<sub>2</sub>·EtOH condujo a los dipéptidos buscados **21a,b**, también con rendimientos elevados. La formación de los derivados amídicos **21a,b** fue detectada por la desaparición en los espectros de <sup>1</sup>H RMN del singlete en torno a 3.7 ppm correspondiente al éster metílico, y la aparición de un doblete alrededor de 2.7 ppm que integra para 3 protones, junto a un NH en forma de multiplete en torno a 6.5-7.0 ppm, correspondientes al grupo metilamino. En los espectros de <sup>13</sup>C RMN se observó la aparición de una señal en torno a 26-29 ppm que se asignó al grupo N-metilo, junto con la desaparición de la señal en torno a 52 ppm correspondiente al éster metílico de los productos de partida. Finalmente, la hidrogenación catalítica de los derivados dipeptídicos **21a,b** utilizando Pd-C como catalizador, seguida de la correspondiente N-acilación con cloruro de acetilo o pivaloilo, condujo a los derivados **22a,b** y **23a,b** con rendimientos variables dependiendo de la naturaleza del grupo R<sup>2</sup>. Así, la acilación con cloruro de pivaloilo transcurrió con rendimientos de buenos a moderados, mientras que las reacciones con cloruro de acetilo, condujeron a mezclas complejas de

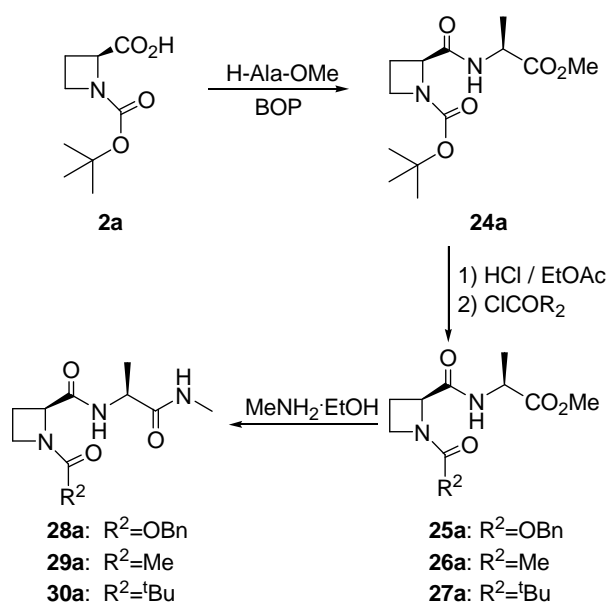
reacción de las que se aisló el producto acetilado con bajo rendimiento. En los espectros de RMN de estos últimos compuestos, se observa la desaparición de las señales aromáticas correspondientes al grupo Z. Además, en los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN se observa la desaparición de la señal del carbono carbonílico del grupo Z, en torno a 155 ppm, conjuntamente con la aparición de una nueva señal de carbono cuaternario, en torno a 173 ppm (para los derivados acetilados) o 178 ppm (para los derivados con un resto de pivaloilo). Por otra parte, para los *N*-acetilderivados **22a,b** aparecen señales metílicas en torno a 2 y 19-22 ppm en los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, respectivamente. Para los *N*-pivaloilderivados **23a,b** aparecen señales de carbono primario y cuaternario en torno a 27 y 39 ppm en  $^{13}\text{C}$  RMN, junto a un singlete alrededor de 1.20 ppm que integra para 9 protones en  $^1\text{H}$  RMN, correspondientes al grupo *terc*-butilo.



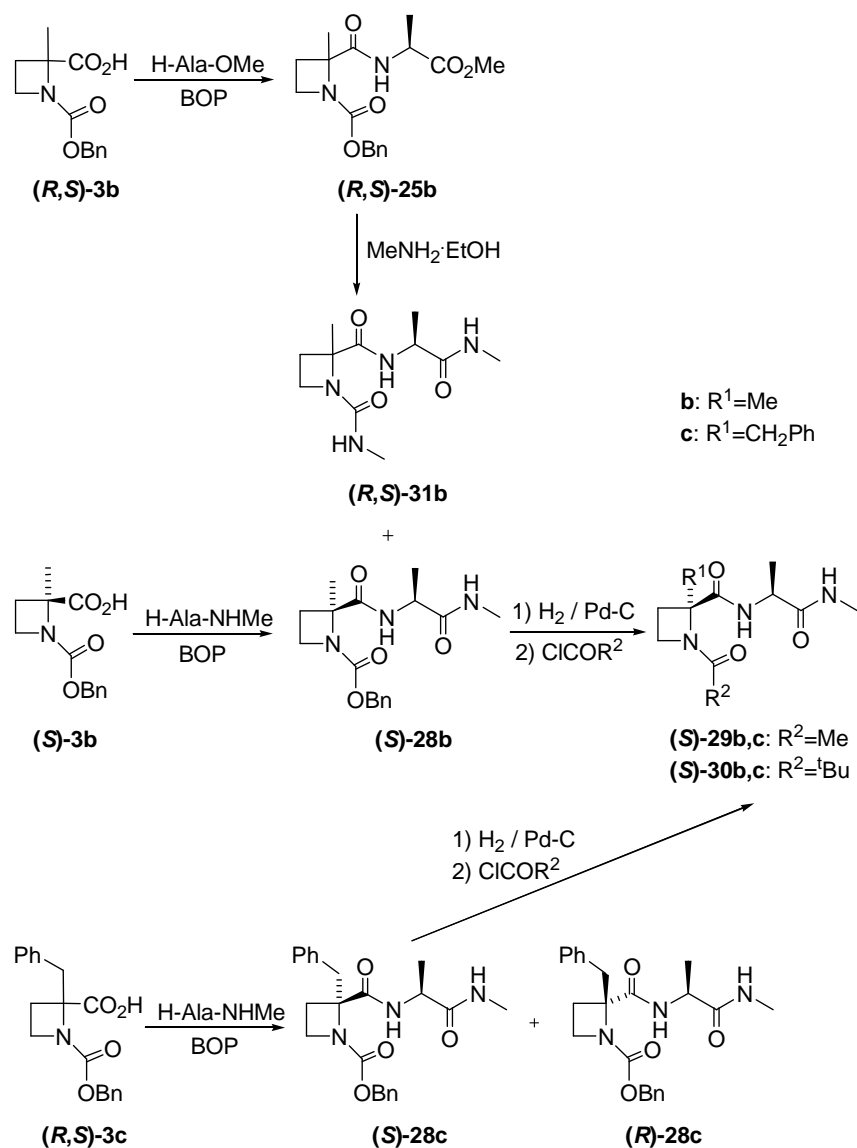
Esquema 6

Por otra parte, la síntesis de los derivados dipeptídicos de azetidina se llevó a cabo de manera análoga a la comentada para los derivados de prolina, exceptuando los

dipéptidos de azetidina-2-carboxilato, que siguieron una ruta sintética alternativa debido a que el derivado de Azg de partida **2a** contenía un grupo *tert*-butoxicarbonilo en el extremo *N*-terminal (Esquema 7). De esta forma, en primer lugar se realizó el acoplamiento peptídico entre Boc-Azg-OH (**2a**) y H-Ala-OMe, utilizando BOP como agente de acoplamiento, dando lugar al dipéptido **24a** (93 %). El siguiente paso sintético consistió en la eliminación del grupo protector Boc mediante tratamiento con disolución de AcOEt saturado con HCl, seguido de la introducción de los grupos benciloxycarbonilo, acetilo o pivaloilo para dar lugar a los compuestos **25a-27a** (Esquema 7). En los espectros de  $^1\text{H}$  RMN de estos compuestos se observa la desaparición del singlete en torno a 1.40 ppm y en los de  $^{13}\text{C}$  RMN de las señales a 80 y 28 ppm, atribuibles al grupo *tert*-butoxicarbonilo, junto a la aparición de las señales correspondientes a los grupos benciloxycarbonilo, acetilo o pivaloilo. La posterior transformación de los ésteres **25a-27a** en sus amidas correspondientes con  $\text{MeNH}_2 \cdot \text{EtOH}$  condujo a los dipéptidos buscados **28a-30a** con rendimientos elevados.



Esquema 7



Esquema 8

Para la preparación de los dipéptidos **(R,S)-25b** se llevó a cabo el acoplamiento entre **(R,S)-3b** y H-Ala-OMe (Esquema 8), utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente. Como era de esperar, debido a la falta de enantioselectividad con que se forma la azetidina de partida **(R,S)-3b**, el dipéptido Z-Aza-Ala-OMe [**(R,S)-25b**] se obtuvo como mezcla de los dos posibles diastereoisómeros, sin que fuera posible determinar su proporción debido a los complejos espectros de RMN obtenidos. Los

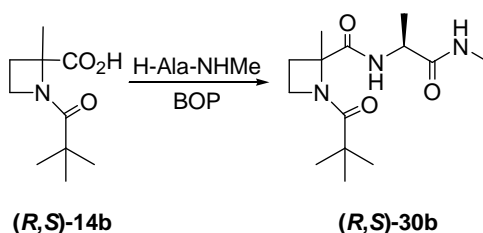


intentos de separación de esta mezcla diastereoisomérica por TLC y HPLC fueron infructuosos. La transformación de los ésteres (**R,S**)-**25b** en sus correspondientes amidas condujo al producto buscado **28b** con tan sólo un 14 % de rendimiento, obteniéndose de forma mayoritaria un compuesto no deseado [(**R,S**)-**31b**], que se comentará con detalle más adelante. Es de señalar que el compuesto **28b** obtenido a partir de una mezcla diastereoisomérica, se aisló como un único diastereoisómero, aunque experimentos NMR no permitieron su asignación inequívoca. Con el fin de determinar la configuración absoluta del dipéptido **28b** obtenido a partir de (**R,S**)-**25b**, decidimos acoplar directamente el derivado **3b**, de configuración conocida 2*S*, con H-Ala-NHMe para obtener el compuesto (**S**)-**28b** diastereoméricamente puro (Esquema 8). La comparación de los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN de este compuesto [(**S**)-**28b**] así como del valor de rotación óptica, con los del dipéptido **28b** proveniente de la reacción de la mezcla diastereoisomérica (**R,S**)-**25b** con metilamina, mostró que ambos compuestos eran idénticos, permitiendo así la asignación de la configuración absoluta en el carbono 2 como *S*, para el único diastereoisómero de **28b** obtenido a partir de (**R,S**)-**25b**. Seguidamente se llevó a cabo la hidrogenación catalítica de (**S**)-**28b** con Pd-C y posterior acilación del NH resultante con cloruro de acetilo o pivaloilo, dando lugar a los dipéptidos **29b** y **30b**, con estereoquímica *S* en el carbono 2 del anillo de Aza (Esquema 8).

Debido a la formación mayoritaria del compuesto no deseado (**R,S**)-**31b**, para la formación del derivado dipeptídico que contiene un residuo de Azf (**R,S**)-**28c** se decidió seguir una ruta alternativa, mediante el acoplamiento directo de la azetidina (**R,S**)-**3c** (*R:S*, 1:3.5) y H-Ala-NHMe. Los diastereoisómeros (**S**)-**28c** y (**R**)-**28c** pudieron ser separados cromatográficamente, observándose una proporción diastereoisomérica de 4:1, favorable al diastereoisómero de configuración 2*S*. A partir de este momento, las reacciones siguientes se realizaron únicamente con el diastereoisómero (**S**)-**28c**. Así, la hidrogenación de (**S**)-**28c**, mediante el uso de Pd-C como catalizador, seguida de *N*-acilación con cloruro de acetilo o pivaloilo, condujo a los derivados buscados (**S**)-**29c** y (**S**)-**30c**.

Con objeto de obtener el derivado (**R**)-**30b** se siguió otra ruta alternativa, indicada en el Esquema 9, que consistió en el acoplamiento directo entre (**R,S**)-**14b** y H-Ala-NHMe, utilizando BOP como agente de acoplamiento, para dar lugar a la mezcla (**R,S**)-**30b** con alto rendimiento, que no pudo separarse. La comparación de los espectros

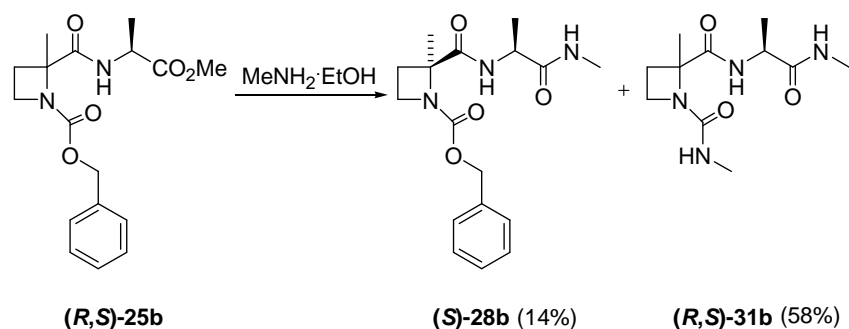
de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN de la pareja de diastereoisómeros de **(R,S)-30b** con el derivado **(S)-30b** resultante de la desprotección y acilación de **(S)-28b** (Esquema 8), permitió realizar la asignación inequívoca de la mezcla diastereoisomérica **(R,S)-30b**. Idéntica ruta sintética para el análogo acetilado **(R,S)-29b** proporcionó una mezcla compleja de productos de reacción que no pudieron ser caracterizados.



Esquema 9

Como era de esperar, en los espectros de RMN de los derivados dipeptídicos **21-23** y **28-30** se observa, en general, una duplicidad clara de la mayoría de las señales. Es de resaltar que la relación entre las integrales de los protones desdoblados variaba al cambiar de disolvente, de  $\text{CDCl}_3$  a DMSO, observándose además acercamiento de las señales equivalentes en los estudios de  $^1\text{H}$  RMN a alta temperatura en DMSO, aunque sin llegar a la temperatura de coalescencia a  $60\text{ }^\circ\text{C}$ . Por lo tanto, la duplicidad de dichas señales se atribuyó a la isomería *cis/trans* en torno al enlace amida *N*-terminal. La presencia de rotámeros *cis/trans* ya se había observado en otros derivados peptídicos que contienen prolina, debido a la menor diferencia de energía entre la conformación *cis* y *trans* del enlace amida Xaa-Pro<sup>131-135</sup>. Las proporciones de rotámeros *cis/trans* se indicarán con detalle posteriormente en el apartado 1.4.2.3.

Como ya se ha comentado, en la reacción de Z-Aza-Ala-OMe [**(R,S)-25b**] con metilamina se obtuvo como producto mayoritario el compuesto no deseado **(R,S)-31b**, resultante del ataque nucleófilo intermolecular del nitrógeno de la metilamina al carbono carbonílico del grupo benciloxicarbonilo (Esquema 10). Como era de esperar, al ser el dipéptido de partida **(R,S)-25b** una mezcla diastereoisomérica, el compuesto **(R,S)-31b** se obtuvo como mezcla de los dos posibles diastereoisómeros en proporción 1.2:1, que no pudieron separarse.

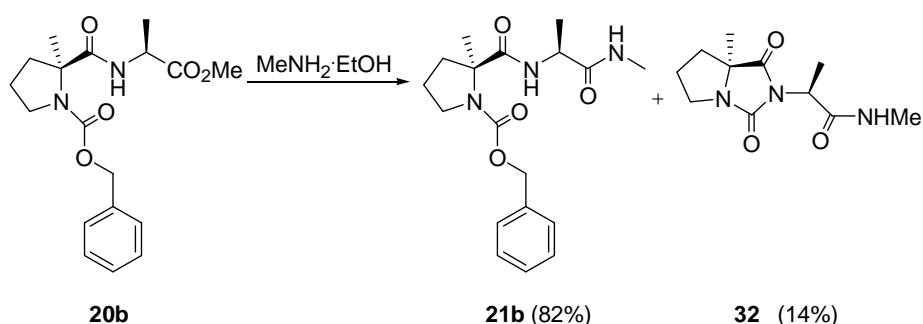


Esquema 10

En el espectro de <sup>1</sup>H RMN de la pareja de diastereoisómeros (**R,S**)-**31b** no se observan señales correspondientes al grupo Z, mientras que aparecen cuatro dobletes en torno a 2.70 ppm correspondientes a los grupos metilos de los agrupamientos CH<sub>3</sub>NH (dos dobletes por cada diastereoisómero). Por otra parte, en el espectro de <sup>13</sup>C RMN aparecen cuatro nuevas señales de carbono primario en torno a 26-27 ppm correspondientes a los mencionados grupos metilo. Finalmente, el espectro de masas de (**R,S**)-**31b** concuerda con la estructura de N-metilurea propuesta en el Esquema 10. Es de señalar que en los espectros de RMN del compuesto **28b** se observó también duplicidad de señales, pero en este caso únicamente debidas a la existencia de rotamería *cis/trans*, como se deduce de los estudios de <sup>1</sup>H RMN a alta temperatura en DMSO, y de la variación de la proporción de las señales duplicadas al cambiar de CDCl<sub>3</sub> a DMSO. Así pues, el compuesto **28b** se corresponde con un único diastereoisómero, por lo que el ataque nucleófilo de la metilamina al extremo N-terminal transcurre con resolución cinética, transformándose completamente uno de los dos diastereoisómeros del producto de partida en el derivado **31b** y el otro sólo parcialmente.

En las reacciones análogas con los dipéptidos derivados de Azg y Pro no se apreció la formación de productos secundarios de reacción. Únicamente en el tratamiento de Z-α-MePro-Ala-OMe (**20b**) con metilamina se observó la aparición de un producto secundario tras 3.5 h de reacción (Esquema 11). Este subproducto se identificó como el tetrahidro-1,3-dioxo-pirrolimidazol **32** a partir de los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN. Así, el análisis del espectro bidimensional HMBC de **32** correlacionó el protón α de Ala con los tres carbonilos presentes en la molécula. Además, en el espectro de <sup>1</sup>H RMN de este compuesto se apreció un cambio en la multiplicidad de la señal correspondiente al protón

$\alpha$ -Ala, pasando de un quintuplete en el producto inicial a un cuartete en **32**, junto con la desaparición de las señales correspondientes al grupo Z y a un NH amídico. En el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN cabe destacar la presencia de un carbono cuaternario sensiblemente más desapantallado que el carbonilo proveniente del grupo Z (159.6 ppm frente a  $\sim 155$  ppm). Además, el pico del ión molecular del espectro de masas también concuerda con la estructura propuesta. La formación del derivado **32** se podría explicar por ataque nucleófilo intramolecular del grupo NH del residuo de alanina al carbono carbonílico del grupo Z.



Esquema 11

Los subproductos (*R,S*)-**31b** y **32**, observados en las reacciones con metilamina, son consecuencia de un ataque nucleófilo sobre el carbonilo del grupo Z. Este ataque se vería favorecido por la existencia de un enlace de hidrógeno intramolecular entre dicho carbonilo y un NH amídico, que conllevaría una menor densidad de carga positiva sobre este carbonilo y por lo tanto sería más susceptible de ataque nucleófilo. Así, en el caso del dipéptido derivado de Aza **28b**, podría existir un enlace de hidrógeno entre dicho carbonilo y el grupo amino del residuo de alanina, favoreciendo el ataque de la metilamina del medio. Por el contrario, para el dipéptido derivado de  $\alpha$ -MePro **21b**, el enlace de hidrógeno tendría que formarse con el grupo NH del residuo de metilamina, de forma que el protón amídico del residuo de alanina se encontrara en una disposición espacial adecuada para el ataque nucleófilo intramolecular. Como se detallará posteriormente, estas hipótesis están en consonancia con los estudios conformacionales de estos dipéptidos, que mostraron diferente tendencia a formar enlaces de hidrógeno según que el péptido incorporara Pro o Azx.

#### 1.4.2. Estudios conformacionales.

##### 1.4.2.1. Estudios teóricos.

Con objeto de evaluar la capacidad inductora de giros inversos de los derivados de Azx (x= g, a), a la par que compararla con la de sus homólogos superiores, prolina y  $\alpha$ -MePro, se realizaron primeramente estudios de modelización molecular. Se eligieron para ello modelos tetrapeptídicos sencillos, reemplazando el aminoácido *N*-terminal por un grupo acetilo y el *C*-terminal por un agrupamiento *N*-metilcarboxamida, modelos que se corresponden con las series de dipéptidos sintetizados. Para explorar el espacio conformacional de los dipéptidos objeto de estudio se llevó a cabo un proceso de templado simulado de dinámica molecular (simulated annealing), utilizando AMBER como campo de fuerzas, implementado en Insight II (versión 2000.1, Byosym Tech, San Diego, USA). Para la realización de la dinámica molecular se partió de diferentes conformaciones iniciales de los dipéptidos objeto de estudio, construidas a partir de distancias y ángulos estándar incluidos en el programa Insight II. Los diferentes conformeros obtenidos dentro del rango de energía +3 Kcal mol<sup>-1</sup> con respecto al mínimo global se agruparon en familias de acuerdo a los ángulos de torsión del esqueleto peptídico ( $\phi$  y  $\psi$ ). A continuación se analizó el ángulo diedro ( $\omega$ ) de la amida *N*-terminal para estudiar la posible existencia de isomería *cis/trans* en torno a dicho enlace. En todos los casos, los conformeros con enlace amida *cis* tenían una energía superior a la del mínimo global con disposición *trans*. Como era de esperar, la proporción de rotámeros *cis* fue menor en los derivados dipeptídicos que contenían  $\alpha$ -MePro o 2-metil-2-carboxiazetidina<sup>134,136</sup>. Seguidamente se realizó un estudio comparativo entre los mínimos obtenidos para los conformeros con disposición *trans* en el enlace amida *N*-terminal y los diferentes tipos de giros  $\beta$  y  $\gamma$  estándar. En este sentido, se midieron una serie de parámetros característicos de estos tipos de giro. Así, se evaluó la distancia entre los carbonos  $\alpha$  del primer (en nuestro modelo CH<sub>3</sub> del acetilo *N*-terminal) y cuarto residuo (N-CH<sub>3</sub> *C*-terminal) ( $\alpha C^i - \alpha C^{i+3} < 7 \text{ \AA}$ ), el valor del ángulo pseudodiedro  $\tau$  ( $-90^\circ \leq \tau \leq 90^\circ$ ), y la distancia entre el oxígeno del grupo carbonilo del primer residuo y el protón amídico del cuarto ( $CO^i - NH^{i+3} \leq 2.5 \text{ \AA}$ ). Por otra parte, para estudiar los posibles giros  $\gamma$ , se analizó la distancia entre el carbonilo del primer residuo y el protón amídico

del tercero ( $\text{CO}^i\text{-NH}^{i+2} \leq 2.5 \text{ \AA}$ ), y entre el carbonilo del segundo residuo y el protón amídico del cuarto ( $\text{CO}^{i+1}\text{-NH}^{i+3} \leq 2.5 \text{ \AA}$ ). Estos resultados se encuentran recogidos en forma de histogramas en las Figuras 9 y 10. Finalmente, para la clasificación del tipo de giro  $\beta$  o  $\gamma$ , se estudiaron los valores de los ángulos de torsión de los residuos centrales del giro.

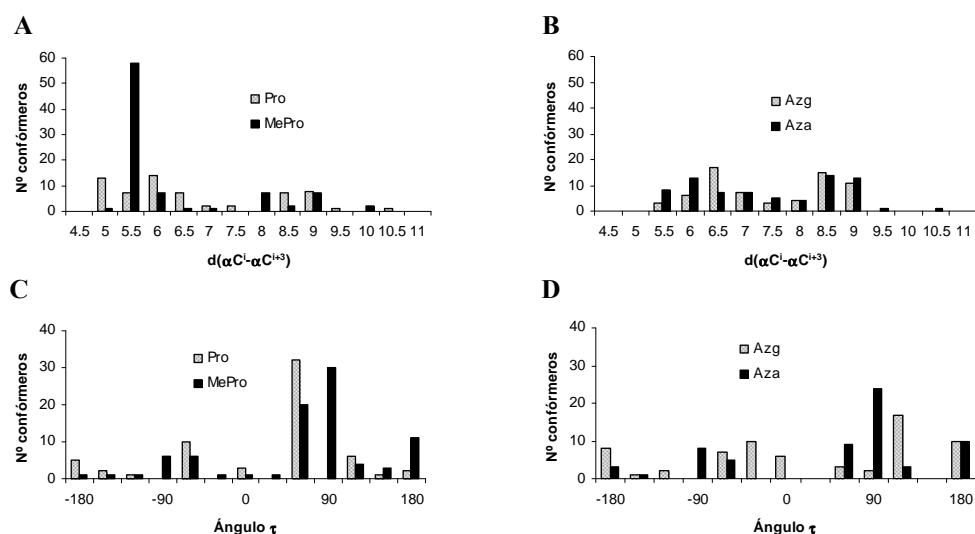


Figura 9. Distribución de las distancias  $\alpha\text{C}^i\text{-}\alpha\text{C}^{i+3}$  (Å) (A y B) y ángulo  $\tau$  (C y D) de los conformeros *trans* de mínima energía (+3 Kcal/mol del mínimo global) obtenidos tras el estudio de dinámica molecular de los dipéptidos Ac-Xaa-Ala-NHMe (Xaa= Pro,  $\alpha$ -MePro, Azg, Aza).

Analizando los parámetros característicos de los giros  $\beta$  para los derivados dipeptídicos de Pro o  $\alpha$ -MePro recogidos en forma de histograma en la Figura 9A y 9C, se observa que más de un 70 % de los conformeros muestran valores de distancia entre carbonos  $\alpha\text{C}^i\text{-}\alpha\text{C}^{i+3}$  y valores del ángulo pseudodiedro  $\tau$ , dentro de lo esperado para un giro  $\beta$ . Además, un 20 % de los derivados de  $\alpha$ -MePro presentan el enlace de hidrógeno característico de dichos giros (Figura 10A). Cabe señalar también la presencia de conformeros con enlaces de hidrógeno característicos de giros  $\gamma$  (Figura 10C y 10E). Para estos derivados el mínimo global se corresponde con un giro  $\beta$  de tipo I, estabilizado por enlace de hidrógeno para el derivado que incorpora  $\alpha$ -MePro, y con un giro  $\beta$  abierto para el dipéptido que contiene un residuo de Pro. Se observa también la existencia de

conformeros con un giro  $\beta$  de tipo II en torno a +1.5 Kcal/mol con respecto al mínimo global. Considerando que un 70 % de la población de conformeros cumple los requisitos de los giros  $\beta$  y que la modelización molecular suele sobreestimar la proporción de giros  $\gamma^{62,102}$ , estos datos parecen indicar que los dipéptidos que contienen Pro o  $\alpha$ -MePro tienen preferencia a la inducción de giros  $\beta$ , como ya se había descrito para otros péptidos que incluían estos aminoácidos<sup>57,66,69,131,137</sup>. Las Tablas 1 y 2 recogen las familias de mínima energía correspondientes a los dipéptidos Ac-Pro-Ala-NHMe y Ac- $\alpha$ -MePro-Ala-NHMe.

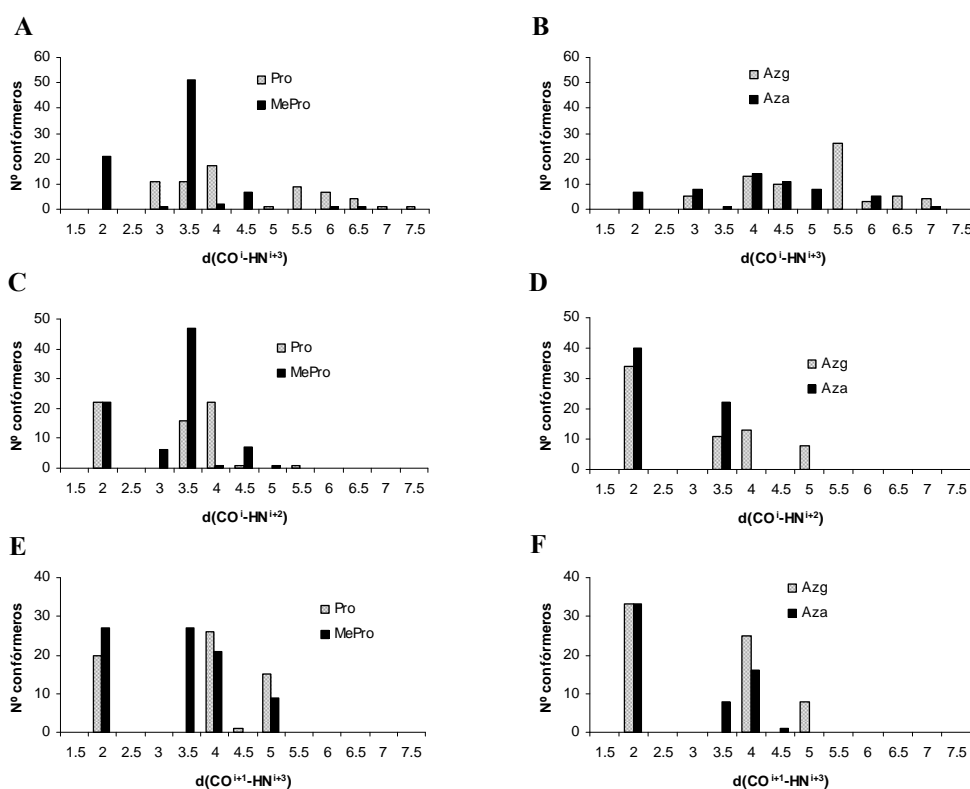


Figura 10. Distribución de las distancias (Å) correspondientes a enlace de hidrógeno intramoleculares  $\text{CO}^i\text{-NH}^{i+3}$  (A y B),  $\text{CO}^i\text{-NH}^{i+2}$  (C y D),  $\text{CO}^{i+1}\text{-NH}^{i+3}$  (E y F) para los conformeros *trans* de mínima energía (+3 Kcal/mol del mínimo global) obtenidos tras el estudio de dinámica molecular de los dipéptidos Ac-Xaa-Ala-NHMe (Xaa= Pro,  $\alpha$ -MePro, Azg, Aza).

Tabla 1. Parámetros topográficos más relevantes para los conformeros de mínima energía de Ac-Pro-Ala-NHMe (**22a**).

CONF.	$\Delta E$ (Kcal/mol)	$\omega$	$\phi_{i+1}$	$\psi_{i+1}$	$\phi_{i+2}$	$\psi_{i+2}$	d(CO <sup>i</sup> - NH <sup>i+3</sup> )	d(CO <sup>i</sup> - NH <sup>i+2</sup> )	d(CO <sup>i+1</sup> - NH <sup>i+3</sup> )	d( $\alpha C^i$ - $\alpha C^{i+3}$ )
<b>22a-1</b>	0	179.1	-49.4	-50.7	-70.5	-55.5	3.22	3.53	4.14	5.12
<b>22a-2</b>	0.19	-179.2	-67.1	-49.5	-84.1	-71.4	3.84	3.91	2.23	5.94
<b>22a-3</b>	0.21	0.6	-69.4	-45.2	-71.2	-57.1	4.11	4.00	4.19	4.41
<b>22a-4</b>	0.39	0.8	-70.1	-49.5	-83.2	-73.4	5.66	4.03	2.24	4.48
<b>22a-5</b>	0.46	-178.5	-77.5	77.4	-71.9	-60.5	4.79	2.17	4.29	8.88
<b>22a-6</b>	0.49	-178.5	-77.2	78.5	-82.1	75.1	5.84	2.19	2.25	9.01
<b>22a-7</b>	0.54	-178.6	-77.5	75.2	-159.0	-60.7	3.14	2.12	4.88	6.76
<b>22a-8</b>	0.69	-179.1	-69.3	-46.8	-155.0	-61.6	6.08	3.89	4.91	6.54
<b>22a-9</b>	0.70	-179.0	-73.9	159.3	-69.9	-59.3	6.74	4.31	4.21	9.12
<b>22a-10</b>	0.77	-179.4	-68.4	-46.1	-150.0	71.7	3.90	3.86	4.07	5.49
<b>22a-11</b>	0.78	-179.0	-74.8	86.1	58.9	63.4	3.31	2.31	4.07	5.48
<b>22a-12</b>	0.89	-178.6	-77.5	76.8	-155.0	77.2	5.28	2.15	4.22	8.26
<b>22a-13</b>	0.91	0.5	-75.9	157.8	-69.9	-59.3	7.92	5.83	4.21	8.16
<b>22a-14</b>	0.93	0.5	-75.8	156.6	-82.1	74.1	6.44	5.81	2.23	7.77
<b>22a-15</b>	0.95	0.7	-71.5	-44.0	-155.0	-61.6	5.88	4.00	4.91	7.07
<b>22a-16</b>	1.03	-178.6	-77.6	75.8	-159.0	150.3	6.32	2.14	4.95	8.67
<b>22a-17</b>	1.04	0.6	-70.5	-43.3	-149.0	-71.7	4.49	3.97	4.06	5.65
<b>22a-18</b>	1.19	-179.9	-53.7	142.9	-82.0	74.8	5.32	3.95	2.24	8.62
<b>22a-19</b>	1.21	-178.9	-68.7	-47.6	71.6	-69.8	5.46	3.89	2.08	8.95
<b>22a-20</b>	1.28	0.8	-73.4	144.6	57.6	65.6	5.99	5.62	4.10	4.51
<b>22a-21</b>	1.29	0.9	-71.1	-44.3	57.9	66.4	7.02	4.00	4.12	7.98
<b>22a-22</b>	1.32	179.7	-51.7	119.7	57.5	61.2	2.95	3.32	3.98	5.62
<b>22a-23</b>	1.33	0.8	-71.5	-44.2	-156.0	152.5	7.05	4.01	4.94	7.21
<b>22a-24</b>	1.48	0.6	-75.0	152.0	-153.0	76.4	8.10	5.74	4.19	8.27
<b>22a-25</b>	1.49	-179.0	-72.8	150.5	-157.0	152.2	7.48	4.10	4.94	10.50
<b>22a-26</b>	1.67	0.7	-74.7	149.5	-158.0	151.8	8.96	5.71	4.94	7.46
<b>22a-27</b>	1.77	-178.9	-76.1	82.5	67.4	170.4	6.12	2.24	4.91	7.50
<b>22a-28</b>	1.95	0.5	-58.3	137.6	71.2	-70.6	5.35	5.51	2.08	4.39
<b>22a-29</b>	2.09	179.7	-51.2	-51.5	66.4	170.9	6.73	3.59	4.90	9.48



Tabla 2. Parámetros topográficos más relevantes para los conformeros de mínima energía de Ac- $\alpha$ -MePro-Ala-NHMe (**22b**).

CONF.	$\Delta E$ (Kcal/mol)	$\omega$	$\phi_{i+1}$	$\psi_{i+1}$	$\phi_{i+2}$	$\psi_{i+2}$	d(CO <sup>i</sup> - NH <sup>i+3</sup> )	d(CO <sup>i</sup> - NH <sup>i+2</sup> )	d(CO <sup>i+1</sup> - NH <sup>i+3</sup> )	d( $\alpha C^{i+1}$ - $\alpha C^{i+3}$ )
<b>22b-1</b>	0	-179.9	-49.3	-39.7	-60.8	36.1	2.18	3.20	3.40	5.57
<b>22b-2</b>	0.05	-178.4	-74.4	64.7	-78.9	68.8	5.65	1.98	2.08	8.89
<b>22b-3</b>	0.48	-178.5	-74.5	65.5	71.0	-64.7	5.29	1.98	1.99	6.69
<b>22b-4</b>	0.49	-178.3	-74.5	64.0	-70.0	-55.4	4.43	1.97	4.12	8.65
<b>22b-5</b>	0.63	-178.4	-73.7	65.6	-158.0	-57.2	2.95	1.96	4.86	6.46
<b>22b-6</b>	0.63	-178.8	-61.4	-39.8	-65.2	-47.7	2.93	3.50	3.82	5.43
<b>22b-7</b>	0.70	179.7	-51.4	-46.5	70.3	-65.8	5.16	3.43	1.99	8.85
<b>22b-8</b>	1.06	-179.4	-69.2	173.9	-79.0	68.8	5.19	4.65	2.07	7.92
<b>22b-9</b>	1.12	-178.6	-73.6	67.3	57.7	57.8	3.60	1.99	3.90	5.78
<b>22b-10</b>	1.17	-178.4	-74.5	64.2	-152.0	70.2	4.84	1.97	4.13	7.86
<b>22b-11</b>	1.27	179.4	-51.5	-44.7	-154.0	-61.9	5.50	3.40	4.93	6.18
<b>22b-12</b>	1.53	179.2	-52.2	135.8	71.7	-63.4	3.56	3.75	1.97	5.82
<b>22b-13</b>	1.66	178.9	-50.7	108.5	57.2	38.3	2.12	2.98	3.34	5.04
<b>22b-14</b>	1.68	-179.5	-69.4	174.1	-67.4	-54.6	6.73	4.65	4.04	8.67
<b>22b-15</b>	1.94	-178.7	-63.3	-40.7	56.3	58.8	6.19	3.56	3.89	8.80
<b>22b-16</b>	1.94	3.4	-48.1	-49.2	-75.8	72.5	5.82	3.98	2.09	4.08
<b>22b-17</b>	2.36	-179.5	-68.1	168.6	54.7	56.7	4.37	4.54	3.81	7.01
<b>22b-18</b>	2.45	-179.4	-69.0	173.4	-149.0	72.9	6.91	4.63	4.06	9.94
<b>22b-19</b>	2.69	-1.2	-65.7	-37.4	-70.0	-53.6	3.94	3.74	4.08	4.14

A modo de ejemplo, en la Figura 11 se muestran las familias de conformeros de mínima energía para los derivados de  $\alpha$ -MePro.

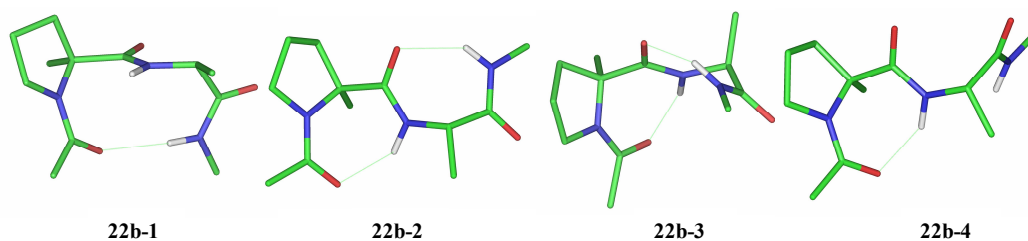


Figura 11. Conformeros de mínima energía para Ac- $\alpha$ -MePro-Ala-NHMe (**22b**).

En relación a los dipéptidos que contienen Azg y Aza se observa una disminución apreciable de la población que cumple los requisitos para la formación de giros  $\beta$  (Figura 9B y 9D), junto a un incremento en los conformeros que poseen enlace de hidrógeno característico de giros  $\gamma$  (Figura 10D y 10F). Cabe resaltar que los derivados dipeptídicos en cuya secuencia hay un residuo de Azg o Aza poseen la misma conformación en el mínimo global, en la que coexisten dos giros  $\gamma$  (conformeros **29a-1** y **29b-1**). Además, en torno a una ventana de +1 Kcal/mol del mínimo global, las familias de conformeros son comunes, si bien no siempre en el mismo orden energético. En la Figura 12 están representados los conformeros de mínima energía para los derivados que contienen Aza, mientras que en las Tablas 3 y 4 se recogen los parámetros topográficos de las familias de mínima energía correspondientes a los dipéptidos Ac-Azx-Ala-NHMe **29a** y **29b**. Es de señalar que, de los dos posibles giros  $\gamma$ , el formado entre los residuos  $i$  e  $i+2$  conduce, en general, a familias de conformeros de menor energía y se corresponde siempre a un giro  $\gamma$  inverso, que es el esperado para los derivados de azetidina de configuración *S* en el carbono 2. Por otra parte, en el giro  $\gamma$  detectado entre los residuos  $i+1$  e  $i+3$  no se observa una preferencia significativa por un tipo de giro  $\gamma$ , existiendo familias con giros  $\gamma$  clásicos e inversos.

En conjunto, debido a la acusada disminución de la población de conformeros que cumplen los requisitos estructurales de giro  $\beta$ , junto al aumento del número de conformeros que poseen el enlace de hidrógeno característico de giros  $\gamma$  (en particular entre el residuo  $i$  e  $i+2$ ), se puede concluir que los derivados de 2-carboxiazetidina presentan cierta tendencia a la inducción de giros  $\gamma$ .

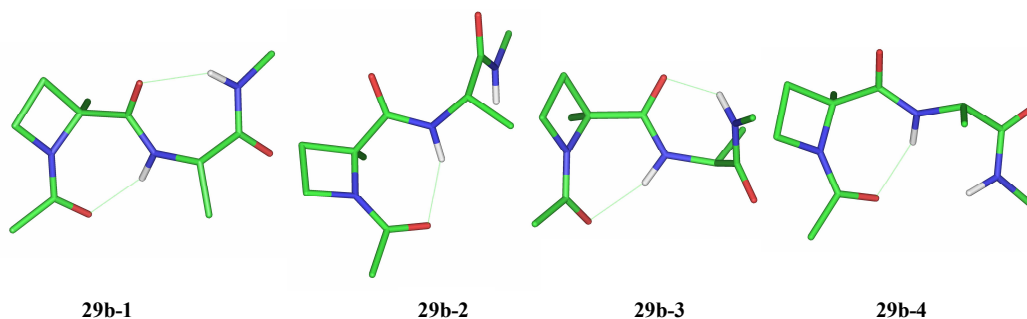


Figura 12. Conformeros de mínima energía para Ac-Aza-Ala-NHMe (**29b**).

Tabla 3. Parámetros topográficos más relevantes para los conformeros de mínima energía de Ac-Azg-Ala-NHMe (**29a**).

CONF.	$\Delta E$ (Kcal/mol)	$\omega$	$\phi_{i+1}$	$\psi_{i+1}$	$\phi_{i+2}$	$\psi_{i+2}$	$d(\text{CO}^i\text{-NH}^{i+3})$	$d(\text{CO}^i\text{-NH}^{i+2})$	$d(\text{CO}^{i+1}\text{-NH}^{i+3})$	$d(\alpha\text{C}^i\text{-}\alpha\text{C}^{i+3})$
<b>29a-1</b>	0	-174.7	-69.6	58.0	-78.8	69.0	5.71	2.00	2.08	8.98
<b>29a-2</b>	0.31	1.5	-63.5	-47.6	-79.1	68.7	5.80	4.04	2.09	4.44
<b>29a-3</b>	0.37	177.9	-57.8	-48.4	-80.0	67.2	3.94	3.77	2.09	6.36
<b>29a-4</b>	0.42	-174.8	-69.7	59.4	70.4	-64.9	5.36	2.01	1.99	7.00
<b>29a-5</b>	0.45	-174.5	-69.9	56.5	-70.6	-56.4	4.41	1.99	4.16	8.68
<b>29a-6</b>	0.48	-175.8	-67.5	59.0	-158.0	-56.5	2.85	1.98	4.85	6.53
<b>29a-7</b>	0.70	-1.0	-63.9	-48.3	-70.3	-55.2	4.25	4.06	4.13	4.32
<b>29a-8</b>	0.71	176.1	-54.1	-43.3	-65.6	-48.0	2.96	3.56	3.84	5.68
<b>29a-9</b>	1.06	-175.9	-67.8	62.7	57.7	58.6	3.54	2.03	3.94	6.05
<b>29a-10</b>	1.15	179.7	-60.8	-46.1	70.1	-65.8	5.61	3.74	1.99	9.00
<b>29a-11</b>	1.22	-177.8	-67.2	179.6	-78.4	69.2	5.29	4.97	2.08	7.86
<b>29a-12</b>	1.27	-174.8	-69.8	58.1	-157.0	156.5	6.20	2.01	4.97	8.57
<b>29a-13</b>	1.35	4.6	-71.9	174.7	-78.6	69.1	6.18	6.09	2.08	7.50
<b>29a-14</b>	1.51	1.6	-64.1	116.5	71.5	-64.4	5.39	5.21	1.99	4.84
<b>29a-15</b>	1.62	1.8	-64.6	-44.2	-154.0	-62.4	5.85	3.98	4.94	6.81
<b>29a-16</b>	1.66	179.4	-60.9	-44.4	-155.0	-62.0	5.86	3.71	4.93	6.37
<b>29a-17</b>	1.73	178.7	-59.9	-44.5	-155.0	157.4	6.28	3.70	4.97	7.38
<b>29a-18</b>	1.84	-177.8	-67.3	178.8	-67.6	-55.3	6.92	4.95	4.07	8.60
<b>29a-19</b>	1.93	2.1	-65.0	-46.3	55.9	60.5	6.99	4.02	3.94	7.99
<b>29a-20</b>	1.94	4.6	-72.1	175.3	-67.4	-55.4	7.71	6.09	4.07	8.15
<b>29a-21</b>	1.97	3.6	-67.8	111.9	-68.5	-56.4	7.69	5.12	4.13	7.78
<b>29a-22</b>	2.00	179.7	-60.8	-45.3	56.1	60.1	6.47	3.73	3.93	8.90
<b>29a-23</b>	2.33	4.1	-68.3	110.2	-157.0	-62.7	6.43	5.08	4.92	6.12
<b>29a-24</b>	2.51	3.8	-70.0	168.1	-156.0	-63.1	8.08	6.04	4.93	8.32
<b>29a-25</b>	2.82	2.3	-65.5	-46.7	65.2	176.3	8.12	4.04	4.82	8.45

Tabla 4. Parámetros topográficos más relevantes para los conformeros de mínima energía de Ac-Aza-Ala-NHMe (**29b**).

CONF.	$\Delta E$ (Kcal/mol)	$\omega$	$\phi_{i+1}$	$\psi_{i+1}$	$\phi_{i+2}$	$\psi_{i+2}$	d(CO <sup>-</sup> - NH <sup>++3</sup> )	d(CO <sup>-</sup> - NH <sup>++2</sup> )	d(CO <sup>++1</sup> - -NH <sup>++3</sup> )	d( $\alpha C^{i+1}$ - $\alpha C^{i+3}$ )
<b>29b-1</b>	0	-176.0	-68.4	54.7	-79.1	68.6	5.69	1.98	2.08	8.94
<b>29b-2</b>	0.41	-175.8	-68.7	53.6	-70.3	-55.6	4.31	1.97	4.13	8.60
<b>29b-3</b>	0.50	-176.0	-68.6	55.8	70.3	-65.0	5.41	1.98	1.99	7.06
<b>29b-4</b>	0.52	-176.9	-66.7	56.4	-158.0	-56.1	2.82	1.96	4.85	6.45
<b>29b-5</b>	0.84	176.8	-56.9	-46.6	-79.2	67.2	3.84	3.71	2.09	6.20
<b>29b-6</b>	1.08	174.8	-51.8	-35.0	-60.6	-38.8	2.25	3.29	3.53	5.62
<b>29b-7</b>	1.11	-175.9	-68.6	54.0	-153.0	70.2	4.75	1.97	4.13	7.79
<b>29b-8</b>	1.15	-176.7	-67.3	57.9	57.2	58.7	3.66	1.99	3.93	6.10
<b>29b-9</b>	1.32	-176.0	-68.6	55.1	-157.0	156.7	6.18	1.99	4.97	8.48
<b>29b-10</b>	1.36	-177.9	-67.8	-166.0	-78.5	69.1	5.08	5.15	2.08	7.46
<b>29b-11</b>	1.43	-2.8	-59.4	-44.2	-78.5	69.3	5.82	3.88	2.09	4.40
<b>29b-12</b>	1.67	178.6	-60.0	-44.0	70.7	-65.7	5.60	3.68	1.99	8.95
<b>29b-13</b>	1.74	-3.8	-59.6	-45.5	-70.7	-55.2	3.97	3.90	4.16	4.06
<b>29b-14</b>	1.83	-178.0	-67.4	-167.0	70.5	-64.9	4.31	5.12	1.98	7.65
<b>29b-15</b>	1.98	-177.9	-67.9	-166.0	-67.7	-55.2	6.86	5.15	4.08	8.17
<b>29b-16</b>	2.32	0.7	-71.0	-174.0	-78.8	69.0	5.97	6.15	2.08	7.39
<b>29b-17</b>	2.66	-177.8	-67.9	-166.0	-157.0	158.0	8.01	5.15	4.97	10.65
<b>29b-18</b>	2.76	-2.8	-59.6	-41.0	-153.0	-62.4	5.58	3.80	4.94	6.54
<b>29b-19</b>	2.76	0.4	-70.1	-177.0	70.0	-65.5	5.78	6.12	1.99	5.25
<b>29b-20</b>	2.91	0.7	-71.1	-174.0	-67.6	-55.3	7.52	6.15	4.07	8.10
<b>29b-21</b>	2.93	-2.7	-59.6	-42.2	-155.0	157.6	7.15	3.83	4.97	6.84

#### 1.4.2.2. Estudios de IR.

Con objeto de confirmar la presencia de enlace de hidrógeno intramolecular en los derivados dipeptídicos sintetizados se llevaron a cabo experimentos de FT-IR a concentraciones de 2 y 20 mM, en CHCl<sub>3</sub> como disolvente. En particular, se estudiaron las bandas de tensión de NH (amida A) que absorbe en dos regiones, una en torno a 3460-3410 cm<sup>-1</sup>, y otra entre 3380-3300 cm<sup>-1</sup>, correspondientes a NH libres y asociados (con enlace de hidrógeno), respectivamente. Con la excepción del compuesto **22b**, la forma y frecuencia de estas bandas NH fueron independientes de la concentración, lo que indica que los enlaces de hidrógeno observados son intramoleculares y no hay efectos debidos a agregación intermolecular. La existencia de rotamería *cis/trans* en muchos de los dipéptidos se tradujo en espectros complejos, en particular los de los dipéptidos

protegidos con un grupo Z en el extremo *N*-terminal. En general, se observó la presencia de un equilibrio entre formas libres y asociadas. La intensidad de la banda correspondiente a NH asociado fue menor en los dipéptidos que contienen un grupo Z y mayor en los sustituidos con un grupo pivaloilo ( $Z < \text{Ac} < \text{Piv}$ ).

A modo de ejemplo, en la Figura 13 se encuentran recogidos los espectros de IR de los derivados dipeptídicos **23a,b** y **30a,b** que contienen un resto de pivaloilo en el extremo *N*-terminal. Estos espectros presentan una banda en torno a  $3350\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a NHs implicados en enlaces de hidrógeno intramolecular, y bandas a frecuencias superiores correspondientes a NHs libres<sup>131,135,138</sup>.

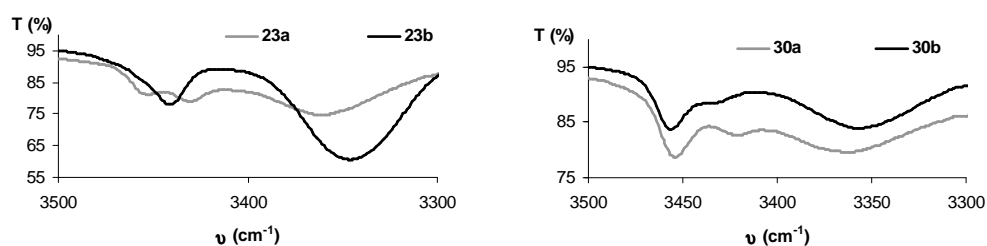


Figura 13. Región de la tensión NH de los espectros de FT-IR de los derivados dipeptídicos Piv-Xaa-Ala-NHMe (**23a**: Xaa=Pro, **23b**: Xaa= $\alpha$ -MePro, **30a**: Xaa=Azg, **30b**: Xaa=Aza).

Es de resaltar la influencia del sustituyente alquílico en posición  $\alpha$  en la intensidad de la banda correspondiente a NH asociado para los dipéptidos objeto de estudio, lo que es consistente con el mayor porcentaje de enlace de hidrógeno observado en los estudios de modelización molecular para los derivados que presentan disustitución en el carbono  $\alpha$  del anillo. Como se observa en la Figura 13, esta influencia es más marcada para el dipéptido que incorpora  $\alpha$ -MePro **23b**, donde se observa un considerable aumento de esta banda en relación a la del compuesto **23a**, que para el que contiene Aza **30b** comparado con el de Azg **30a**.

#### 1.4.2.3. Estudios de RMN.

Un estudio conformacional más completo de los derivados dipeptídicos **21-23** y **28-30** en disolución se realizó mediante  $^1\text{H}$  RMN. Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN de estos derivados mostraron en general la presencia de parejas de señales homólogas, indicativo de la existencia de rotamería *cis/trans* en torno al enlace amida CO-Azx y CO-Pro, en

proporción variable dependiendo del disolvente utilizado y del dipéptido objeto de estudio.

La asignación de conformaciones *cis/trans* en dipéptidos Xaa-Pro se realizó en base a una serie de criterios ampliamente estudiados<sup>57,135,139-142</sup>.

- 1.- Efecto nOe entre el protón  $\alpha$  del aminoácido Xaa y los protones en  $\alpha$  (rotámero *cis*) o  $\delta$  (rotámero *trans*) de prolina.
- 2.- Efecto de anisotropía que ejerce el grupo carbonilo del aminoácido Xaa sobre los protones y el carbono  $\alpha$  de prolina (isómero *trans*), o sobre los protones y carbono  $\delta$  de prolina (isómero *cis*)<sup>57</sup>. Para aplicar este criterio y realizar el análisis comparativo es necesaria la presencia de las dos conformaciones. Así, los confómeros *trans* presentan la señal correspondiente al carbono  $\alpha$  más apantallada que la correspondiente señal del confómero *cis*. Por su parte, los rotámeros *cis* muestran la señal correspondiente al carbono  $\delta$  más apantallada que la del rotámero *trans*.
- 3.- Diferencia en el valor de desplazamiento químico ( $\Delta\delta$ ) entre los carbonos  $\beta$  y  $\gamma$  de prolina. Así, valores de  $\Delta\delta$  entre los carbonos  $\beta$  y  $\gamma$  alrededor de 8-10 ppm son representativos de rotámeros *cis*, mientras que valores en torno a 3-7 ppm lo son de *trans*<sup>57,139,143</sup>. Los rangos indicados corresponden a los estadísticamente más poblados, aunque se observa variabilidad en dicho rango en función del disolvente, siendo siempre el  $\Delta\delta_{\beta\gamma}$  de los rotámeros *trans* inferior al de los *cis*<sup>139</sup>. Este criterio sólo es aplicable para derivados de prolina no sustituidos.

Para la asignación de nuestros dipéptidos utilizamos aquellos criterios que pudieron aplicarse en función de los datos de RMN del derivado dipeptídico objeto de estudio.

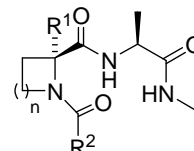
Los porcentajes de rotamería *cis* para los distintos dipéptidos se encuentran recogidos en la Tabla 5. De manera análoga a lo ya observado para otros derivados de prolina, la población de confómeros *cis* aumenta al aumentar la polaridad del disolvente<sup>143</sup>. Cabe señalar que los dipéptidos con un resto de pivaloilo en el extremo N-terminal presentan únicamente el rotámero *trans*.

Los dipéptidos portadores de un residuo de Pro **23a** y de  $\alpha$ -MePro **22b** y **23b** no presentan rotamería *cis/trans*, por lo que los criterios de anisotropía e  $\Delta\delta$  entre carbonos  $\beta$  y  $\gamma$  no pudieron aplicarse. Estos derivados se asignaron en función del efecto nOe

observado entre los protones  $\delta$  del anillo de prolina y los correspondientes al sustituyente *N*-terminal. Para el derivado **22a** estos nOes no fueron concluyentes, y su asignación se realizó en base a criterios de anisotropía. Así, como se indica en la Tabla 6, la señal correspondiente al carbono  $\alpha$ -Pro del conformero minoritario aparece más desapantallada que la correspondiente al isómero mayoritario, mientras que la señal del carbono  $\delta$ -Pro del rotámero minoritario aparece más apantallada que la correspondiente al rotámero mayoritario. Estos datos, junto al valor de  $\Delta\delta$  entre los carbonos  $\beta$  y  $\gamma$ , indican que el rotámero mayoritario es el *trans*. Los rotámeros del dipéptido *Z*- $\alpha$ -MePro-Ala-NHMe (**21b**) no se pudieron asignar siguiendo estos criterios, por lo que se asignó tentativamente el rotámero mayoritario como *trans* en base a la conocida preferencia del residuo de  $\alpha$ -MePro por el isómero *trans* en el enlace amida precedente<sup>134,136</sup>.

Tabla 5. Proporción de rotámeros de derivados dipeptídicos R<sup>2</sup>-Xaa-Ala-NHMe en CDCl<sub>3</sub> y DMSO.

Cpto.	n	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	% <i>Cis</i>	
				CDCl <sub>3</sub>	DMSO
<b>21a</b>	2	H	OBn	28	54
<b>22a</b>			Me	14	29
<b>23a</b>			<sup>t</sup> Bu	0	0
<b>21b</b>		Me	OBn	10	20
<b>22b</b>			Me	0	0
<b>23b</b>			<sup>t</sup> Bu	0	0
<b>28a</b>	1	H	OBn	0	<5
<b>29a</b>			Me	<5	43
<b>30a</b>			<sup>t</sup> Bu	<5	<5
<b>28b</b>		Me	OBn	17	43
<b>29b</b>			Me	<5	23
<b>30b</b>			<sup>t</sup> Bu	0	0
<b>28c</b>		Bn	OBn	<5	31
<b>29c</b>			Me	0	0
<b>30c</b>			<sup>t</sup> Bu	0	0



El derivado dipeptídico Z-Pro-Ala-NHMe (**21a**) fue más complejo de asignar debido a que presentaba datos contradictorios. Aplicando el criterio de anisotropía la conformación mayoritaria debería asignarse como *cis* ya que, como se observa en la Tabla 6, la señal correspondiente al carbono  $\alpha$ -Pro del rotámero minoritario aparece a campo más alto que la correspondiente al rotámero mayoritario, mientras que la señal correspondiente al carbono  $\delta$ -Pro del conformero minoritario aparece a campo más bajo que la correspondiente al conformero mayoritario. Sin embargo, los  $\Delta\delta$  entre los carbonos  $\beta$  y  $\gamma$  muestran que el rotámero mayoritario presenta un  $\Delta\delta = 4.9$  ppm, mientras el correspondiente  $\Delta\delta$  del rotámero minoritario es 7.6 ppm, valores indicativos de que el rotámero mayoritario es *trans*<sup>139,143</sup>. Sin embargo, y teniendo en cuenta la poca variación de los desplazamientos químicos de los C $\alpha$  y C $\delta$  de Pro entre los isómeros *cis/trans*, el aumento del porcentaje del rotámero minoritario de **21a** al pasar de CDCl<sub>3</sub> a DMSO, junto con la dependencia de la relación *cis/trans* con la polaridad del disolvente en el orden CCl<sub>4</sub> < CDCl<sub>3</sub> < (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO < D<sub>2</sub>O<sup>133,135,144-146</sup>, se asignó tentativamente el isómero mayoritario de **21a** en CDCl<sub>3</sub> como *trans*. Estos datos especulativos están apoyados en la literatura, donde está descrito que tanto en enlaces Xaa-Pro como Xaa- $\alpha$ -MePro, el rotámero *trans* es siempre el mayoritario<sup>66,102,133-135,137,139,147</sup>.

Tabla 6. Desplazamiento químico de <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) para C $\alpha$  y C $\delta$  de Pro correspondiente a los rotámeros *cis/trans* de los compuestos **21a** y **22a**.

Compuesto	$\Delta\delta_{\beta-\gamma}$ (ppm)		C $\alpha$ -Pro (ppm)		C $\delta$ -Pro (ppm)	
	may.	min.	may.	min.	may.	min.
<b>21a</b>	4.9	7.6	60.8	60.4	47.0	47.3
<b>22a</b>	3.1	4.7	60.2	62.0	48.5	46.8

En relación a los dipéptidos derivados de Azg (**28a-30a**), Aza (**28b-30b**) y Azf (**28c-30c**), en general, no se pudo aplicar el criterio de anisotropía al no observarse en los espectros de <sup>13</sup>C RMN desdoblamiento de las señales correspondientes a los carbonos 2-C y 4-C, salvo en el caso del dipéptido **28b**. Así, en el espectro de <sup>13</sup>C RMN del compuesto **28b** se observa que la señal correspondiente al carbono 4-C del rotámero minoritario (*cis*) aparece más apantallada (44.2 ppm) que la señal del rotámero mayoritario (44.6 ppm). Por otra parte, para la asignación del isómero mayoritario de los dipéptidos **29a,b** y **30a,b** como *trans*, nos basamos en el efecto nOe observado entre los protones del grupo R<sup>2</sup> y los



H-4 del anillo de azetidina. Señales más débiles se observaron para los correspondientes rotámeros minoritarios, entre los protones del grupo R<sup>2</sup> y los H-2 o  $\alpha$ -CH<sub>3</sub>. Para los compuestos **28a,c**, **29c** y **30c** no fue posible la aplicación de ninguno de los criterios anteriores. Sin embargo, teniendo en cuenta la alta preferencia de los restantes derivados por adoptar conformación *trans*, se asignó tentativamente el rotámero mayoritario de todos ellos como *trans*.

Como ya se había observado para el equilibrio *cis/trans* en torno al enlace peptídico de Xaa-Pro, la presencia de un sustituyente en el carbono  $\alpha$  del anillo de azetidina o pirrolidina aumenta, de forma general, la proporción de isómero *trans*<sup>134,136</sup>. Este hecho se atribuye fundamentalmente a interacciones estéricas de los grupos alquilo en posición  $\alpha$  del anillo de prolina o en posición 2 del de azetidina, con el residuo R<sup>2</sup> correspondiente, que desestabiliza el isómero *cis*. Tan sólo se observan dos excepciones, recogidas en la Tabla 5, donde los derivados dipeptídicos **28b,c** presentan un mayor porcentaje de rotámero *cis* en CDCl<sub>3</sub> y DMSO que el correspondiente dipéptido **28a**, que no tiene sustituyente en posición 2 del anillo de azetidina. Si se analiza la influencia del sustituyente R<sup>2</sup> en el equilibrio *cis/trans* se aprecia que los dipéptidos con un grupo pivaloilo presentan menor rotamería que los correspondientes análogos con un resto de acetilo, debido probablemente a razones estéricas. Los derivados dipeptídicos con un grupo Z en el extremo N-terminal muestran, en general, mayor porcentaje de rotámero *cis* que los correspondientes dipéptidos con un grupo alquílico. Aunque se ha descrito que cuando un aminoácido aromático antecede al residuo de prolina, se incrementa la población de isómero *cis* mediante interacción entre el  $\delta(+)$  del nitrógeno del anillo de prolina y el anillo aromático del aminoácido precedente<sup>132,148</sup>, los estudios de dinámica molecular llevados a cabo para nuestros derivados Z-Xaa-Ala-NHMe (Xaa= Pro,  $\alpha$ -MePro, Azg, Aza) han mostrado que esta interacción no está presente en los conformeros de mínima energía (+3 Kcal/mol respecto al mínimo global) de estos dipéptidos. Estos estudios teóricos sugieren que podrían existir estabilizaciones adicionales del conformero *cis*, mediante un enlace de hidrógeno intramolecular entre un NH del dipéptido y el oxígeno sp<sup>3</sup> del grupo uretano<sup>149,150</sup>. En menor proporción se encontraron familias de conformeros con interacción entre el NH del residuo de alanina y el anillo aromático del grupo Z<sup>151</sup>, así como interacción entre el oxígeno del grupo carbonilo del residuo de alanina y los protones aromáticos del grupo benciloxicarbonilo<sup>152,153</sup>.

Una vez establecido que para nuestros derivados dipeptídicos el rotámero *trans* es el mayoritario, se estudió la posible adopción de giros inversos por estos dipéptidos, objetivo central de este capítulo. Como ya se ha comentado anteriormente, los giros inversos suelen estar estabilizados por medio de enlaces de hidrógeno intramoleculares entre el oxígeno carbonílico del residuo *i* y el protón del grupo NH del residuo *i*+2 (giro  $\gamma$ ) o *i*+3 (giro  $\beta$ ). Está descrito que valores de desplazamiento químico superiores a 7 ppm en CDCl<sub>3</sub> junto a pequeñas variaciones al cambiar a DMSO, indican que dicho protón amídico podría estar implicado en un enlace de hidrógeno intramolecular<sup>57,131</sup>. Como se observa en la Tabla 7, estos criterios sugieren que para los derivados dipeptídicos que contienen  $\alpha$ -metilprolina, el agrupamiento NH-Me podría formar parte de un enlace de hidrógeno intramolecular, mientras que para los dipéptidos con un anillo de azetidina, el protón NH del residuo de alanina sería el implicado en este tipo de enlaces.

Tabla 7. Desplazamientos químicos y coeficientes de temperatura para los protones NH de los rotámeros *trans* de los dipéptidos R<sup>2</sup>-Xaa-Ala-NHMe.

Compuesto		$\delta$ NH-Ala (ppm)		$\delta$ NH-Me (ppm)		$\Delta\delta/\Delta T^a$	$\Delta\delta/\Delta T^a$
		CDCl <sub>3</sub>	DMSO	CDCl <sub>3</sub>	DMSO	NH-Ala	NH-Me
Z-Pro-Ala-NHMe	<b>21a</b>	6.95	8.02	6.86	7.71	-6.0	-6.3
Ac-Pro-Ala-NHMe	<b>22a</b>	7.09	7.88	6.53	7.56	-5.0	<b>-3.5</b>
Piv-Pro-Ala-NHMe	<b>23a</b>	6.67	7.72	6.90	7.64	-5.3	-4.3
Z-MePro-Ala-NHMe	<b>21b</b>	6.23	7.91	7.02	7.25	-6.5	<i>nd</i> <sup>b</sup>
Ac-MePro-Ala-NHMe	<b>22b</b>	6.44	7.76	7.04	7.50	-5.1	<b>-2.2</b>
Piv-MePro-Ala-NHMe	<b>23b</b>	5.71	7.28	7.22	7.46	-5.9	<b>-2.1</b>
Z-Azg-Ala-NHMe	<b>28a</b>	7.26	8.09	6.71	7.78	-5.3	-4.9
Ac-Azg-Ala-NHMe	<b>29a</b>	7.91	8.13	6.79	7.74	<b>-3.9</b>	-4.3
Piv-Azg-Ala-NHMe	<b>30a</b>	7.60	7.99	6.80	7.75	-4.1	-4.6
Z-Aza-Ala-NHMe	<b>28b</b>	7.74	7.99	6.38	7.75	-4.9	-4.9
Ac-Aza-Ala-NHMe	<b>29b</b>	8.51	8.35	6.44	7.72	<b>-3.3</b>	-4.4
Piv-Aza-Ala-NHMe	<b>30b</b>	8.18	8.07	6.55	7.71	<b>-2.7</b>	-4.0
Z-Azf-Ala-NHMe	<b>28c</b>	8.22	8.11	6.31	7.89	<b>-2.7</b>	-5.4
Ac-Azf-Ala-NHMe	<b>29c</b>	8.78	8.67	6.37	7.78	<b>-2.8</b>	-4.8
Piv-Azf-Ala-NHMe	<b>30c</b>	8.55	8.35	6.49	7.78	<b>-1.8</b>	<b>-3.9</b>

<sup>a</sup>Valores en ppb/K.  $\Delta\delta$  medido en DMSO-d<sub>6</sub>, 30-60 °C. <sup>b</sup>No determinado.

Adicionalmente, se realizaron estudios de la variación del desplazamiento químico de los protones amídicos con la temperatura en DMSO- $d_6$ . Así, se registraron espectros entre 30 y 60 °C, a intervalos de 5 °C, y se calcularon los coeficientes de temperatura para los distintos protones NH de los rotámeros mayoritarios. Valores de coeficientes menores o iguales a 3 ppb/K (en valor absoluto) indican que el protón NH está protegido y no es accesible al disolvente<sup>57,131</sup>. En péptidos de pequeño tamaño, este dato refleja la presencia de enlace de hidrógeno intramolecular. Por el contrario, cuando este valor es superior a 4 ppb/K indican accesibilidad del disolvente al NH, lo cual descarta la existencia de este tipo de enlace, mientras que valores de estos coeficientes en el intervalo de 3-4 ppb/K no son concluyentes.

Como se observa en la Tabla 7, los NHs de los péptidos con un residuo de Pro no presentan en general protección al disolvente, con la posible excepción del compuesto **22a** que posee un coeficiente de temperatura de 3.5 ppb/K para el NH-Me. Por otra parte, los compuestos **22b** y **23b**, que incorporan un residuo de  $\alpha$ -MePro, muestran valores de coeficientes de temperatura que sugieren la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular para el NH-Me. Estos datos, unidos a los previamente obtenidos por medio de los estudios de dinámica molecular, parecen indicar la existencia de giros  $\beta$  en estos dipéptidos que contienen  $\alpha$ -MePro.

Por otra parte, dentro de los derivados que poseen un residuo de Azx, tan sólo el dipéptido Piv-Azf-Ala-NHMe (**30c**) presenta un coeficiente de temperatura para el protón NH-Me en el rango de incertidumbre, mientras que este valor para el resto de los dipéptidos es indicativo de accesibilidad al disolvente, en total concordancia con los valores de los desplazamientos químicos. Por el contrario, los dipéptidos **28c**, **29c** y **30b,c** tienen un valor de  $\Delta\delta/\Delta T$  inferior a 3 ppb/K para el NH del residuo de Ala, indicativo de la existencia de un enlace de hidrógeno  $CO^i-NH^{i+2}$ . Un comportamiento similar se observa para los compuestos **29a,b** aunque los valores de  $\Delta\delta/\Delta T$  están en el rango de incertidumbre donde no es posible confirmar o descartar la presencia de enlace de hidrógeno intramolecular. Sin embargo, **29a,b** tienen valores de  $\delta$  del NH-Ala superiores a 7 ppm en  $CDCl_3$  y variaciones pequeñas de este desplazamiento químico al pasar a DMSO- $d_6$ , por lo que estos NH podrían estar implicados en la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular, aunque más débil. Así, la estructura de los derivados que

contienen 2-carboxiazetidinas **28c**, **29a-c** y **30b,c** parece estar estabilizada por un enlace de hidrógeno intramolecular, característico de giros  $\gamma$ .

Aunque no se encuentra reflejado en la Tabla 7, también se realizaron estudios de  $^1\text{H}$  RMN para los diastereoisómeros **(R)-28c** y **(R)-30b**, de configuración *2R* en el anillo de azetidina. Los valores de desplazamiento químico (ppm) para el derivado **(R)-28c** fueron 8.12 (NH-Ala) y 6.29 (NH-Me) en  $\text{CDCl}_3$  y 8.11 (NH-Ala) y 7.90 (NH-Me) en DMSO, presentando los NH amídicos unos coeficientes de temperatura de 2.7 ppb/K (NH-Ala) y 5.4 ppb/K (NH-Me). Estos valores para el derivado **(R)-30b** fueron 7.88 (NH-Ala) y 6.72 (NH-Me) en  $\text{CDCl}_3$  y 7.95 (NH-Ala) y 7.82 (NH-Me) en DMSO, mostrando los NH amídicos unos coeficientes de temperatura de 2.7 ppb/K (NH-Ala) y 4.4 ppb/K (NH-Me). Estos datos sugieren también la existencia del enlace de hidrógeno intramolecular  $\text{CO}^i\text{-NH}^{i+2}$ , característico de giro  $\gamma$ , para estos dipéptidos con 2-carboxiazetidinas de configuración *2R*.

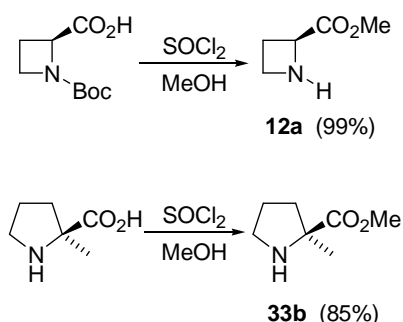
En conjunto, se puede destacar que existe una clara diferencia en el NH implicado en enlace de hidrógeno intramolecular entre los dipéptidos que incorporan derivados de prolina o 2-carboxiazetidina. Así, en los primeros se observa el enlace de hidrógeno característico de giros  $\beta$ , y en los segundos el de giro  $\gamma$ . Por otra parte, los estudios de temperatura han mostrado que la presencia de un grupo benciloxycarbonilo en el extremo *N*-terminal es desfavorable para la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares, mientras que la existencia de disustitución en el carbono  $\alpha$  del esqueleto de azetidina o prolina favorece la formación de dichos enlaces. Además, los valores de los coeficientes de temperatura expuestos en la Tabla 7 muestran que cuando el sustituyente en  $\alpha$  es un grupo bencilo, existe una mayor tendencia a formar enlaces de hidrógeno intramoleculares que cuando es un grupo metilo.

### 1.5. Modelos tetrapeptídicos que incorporan derivados de 2-carboxiazetidina y prolina en posición i+2 (R-CO-Ala-Xaa-NHMe).

#### 1.5.1. Síntesis.

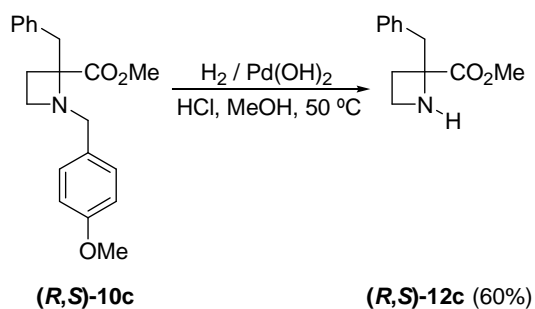
La preparación de los derivados dipeptídicos con un residuo de Pro o Azx en posición i+2 se realizó de manera análoga a la de los dipéptidos **21-23** y **28-30**, anteriormente descritos. En este sentido, fue necesaria la preparación previa de los derivados de aminoácidos no comerciales H-Azx-OMe (**12a,c**), y H- $\alpha$ -MePro-OMe (**33b**), como se detalla en los Esquema 12 y 13.

La síntesis de los derivados H-Azg-OMe (**12a**) y H- $\alpha$ -MePro-OMe (**33b**) se llevó a cabo con buenos rendimientos mediante la esterificación de los productos comerciales Boc-Azg-OH y H- $\alpha$ -MePro-OH con cloruro de tionilo en MeOH. Como era de esperar, en el primer caso junto a la reacción de esterificación de Boc-Azg-OH se produjo la eliminación del grupo *tert*-butoxicarbonilo de la amina secundaria del anillo de azetidina.



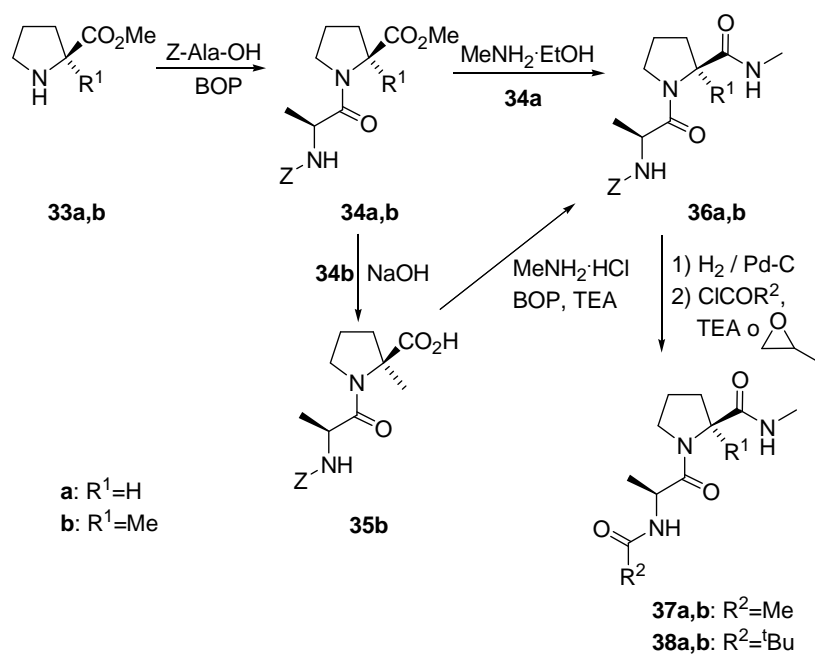
Esquema 12

Por otra parte, la preparación de H-Azf-OMe [(*R,S*)-**12c**] se realizó de manera análoga a la de **12b** (Esquema 3) a partir del *p*-(metoxi)bencil derivado (*R,S*)-**10c**. La hidrogenación catalítica del grupo *p*-(metoxi)bencil de (*R,S*)-**10c** utilizando Pd(OH)<sub>2</sub> como catalizador, 50 °C y una presión de trabajo de 45 psi, condujo al derivado (*R,S*)-**12c** con rendimientos moderados (Esquema 13).



Esquema 13

Una vez sintetizados los aminoácidos de partida convenientemente protegidos se procedió a la síntesis de los derivados dipeptídicos con un residuo conformacionalmente restringido en posición i+2. Para ello se eligieron rutas sintéticas análogas a las utilizadas para los dipéptidos que contienen un anillo de azetidina o prolina en posición i+1 (Esquemas 14-17).



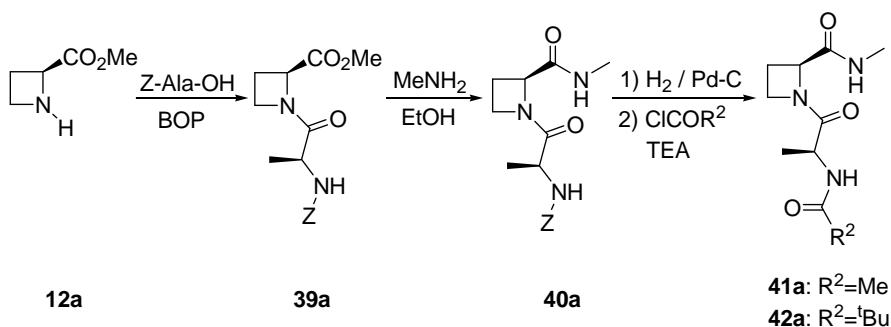
Esquema 14

Para la preparación de los dipéptidos **34a,b** se realizaron los correspondientes acoplamientos entre los derivados de prolina **33a,b** y Z-Ala-OH, utilizando BOP como agente de acoplamiento. Las reacciones de acoplamiento peptídico tuvieron lugar con rendimientos de moderados a buenos, oscilando entre 65-85 %. El siguiente paso de la secuencia sintética consistió en la transformación de los ésteres metílicos del extremo C-terminal de los dipéptidos **34a,b** en las correspondientes metilamidas, para lo que se utilizaron las condiciones desarrolladas anteriormente. En estas condiciones se obtuvo el dipéptido **36a** con excelente rendimiento (97 %), pero no fue posible la obtención de Z-Ala- $\alpha$ -MePro-NHMe (**36b**) después de 7 días de reacción a temperatura ambiente, ni tras 41 h a reflujo en EtOH. Debido a la imposibilidad de sintetizar el derivado **36b** mediante esta vía sintética se abordó una ruta alternativa a partir del ácido carboxílico **35b**. Así, se saponificó el dipéptido **34b** por tratamiento con NaOH 2N, dando lugar a la formación de Z-Ala- $\alpha$ -MePro-OH (**35b**) con un 74 % de rendimiento. El acoplamiento entre el ácido **35b** y MeNH<sub>2</sub>·HCl utilizando BOP como agente de acoplamiento y TEA como base, condujo a Z-Ala- $\alpha$ -MePro-NHMe (**36b**) con un 80 % de rendimiento tras 5 días de reacción. La formación de las amidas **36a,b** se confirmó en <sup>1</sup>H RMN debido a la aparición de un doblete a aproximadamente 2.7 ppm, y de la correspondiente señal en torno a 26-29 ppm en <sup>13</sup>C RMN, propias del grupo CH<sub>3</sub> del agrupamiento metilamino, así como por la aparición de un multiplete correspondiente al NH amídico.

Una vez obtenidos los derivados dipeptídicos **36a,b**, se procedió a la hidrogenación catalítica del grupo benciloxycarbonilo utilizando Pd-C. Seguidamente se llevo a cabo la acilación del NH resultante con cloruro de acetilo o pivaloilo y TEA como base, bajo atmósfera de argón. Así, se obtuvieron los derivados **37b** y **38a,b** con rendimientos muy variables, dependientes tanto del cloruro de acilo utilizado como de la naturaleza del derivado dipeptídico. En general, la utilización de cloruro de pivaloilo condujo a los compuestos finales con rendimientos en torno al 70 %, mientras que la acilación con cloruro de acetilo presentó una mayor disparidad en los rendimientos, encontrándose un rendimiento muy bajo para Ac-Ala- $\alpha$ -MePro-NHMe (**37b**, 7 %). Con el fin de aumentar los rendimientos obtenidos en la formación de derivados acetilados, se exploró un método alternativo de acilación para la preparación de **37a** utilizando óxido de propileno como captador de hidrácido en lugar de TEA, lo que mejoró el rendimiento. En los espectros de <sup>13</sup>C RMN de los derivados dipeptídicos acilados **37** y **38** se observa la desaparición de las señales aromáticas y el carbono carbonílico constituyentes del grupo

Z, junto a la aparición de nuevas señales correspondientes a un resto de acetilo o pivaloilo.

Por otra parte, la síntesis de los derivados dipeptídicos que contienen Azg se realizó de manera análoga a la de Pro, como se recoge en el Esquema 15. Brevemente, el dipéptido **39a** se preparó mediante reacción de **12a** y Z-Ala-OH. Seguidamente se realizó la aminólisis de **39a** mediante reacción con MeNH<sub>2</sub>·EtOH, dando lugar al derivado **40a**. Por último, los derivados dipeptídicos **41a** y **42a**, se sintetizaron mediante hidrogenación del grupo Z seguida por la introducción de un resto de acetilo o pivaloilo. Cabe destacar que el derivado de pivaloilo **42a** se obtuvo tan sólo con un 10 % de rendimiento, mientras que el de acetilo **41a** se aisló con un 80 %.



Esquema 15

La síntesis de los dipéptidos que contienen Aza o Azf, recogida en los Esquemas 16 y 17, fue similar a la relatada para Azg. Sin embargo, al ser los derivados de Aza y Azf mezcla de enantiómeros, el acoplamiento con el residuo de Ala condujo a parejas de diastereoisómeros, que tan sólo pudieron separarse para los dipéptidos que poseen un residuo de Azf.

El Esquema 16 muestra la síntesis de los derivados dipeptídicos que contienen Aza. Para la preparación de estos derivados se hizo reaccionar en primer lugar, el compuesto (*R,S*)-**12b** con Z-Ala-OH, dando lugar a (*R,S*)-**39b**. Como era de esperar, el derivado (*R,S*)-**39b** que incorpora un residuo de Aza presentó una proporción diastereoisomérica de 1.1:1. Desafortunadamente, diferentes intentos de separación cromatográfica de los diastereoisómeros (*R,S*)-**39b** resultaron infructuosos. Seguidamente se hizo reaccionar la mezcla de diastereoisómeros (*R,S*)-**39b** con MeNH<sub>2</sub>·EtOH, lo que

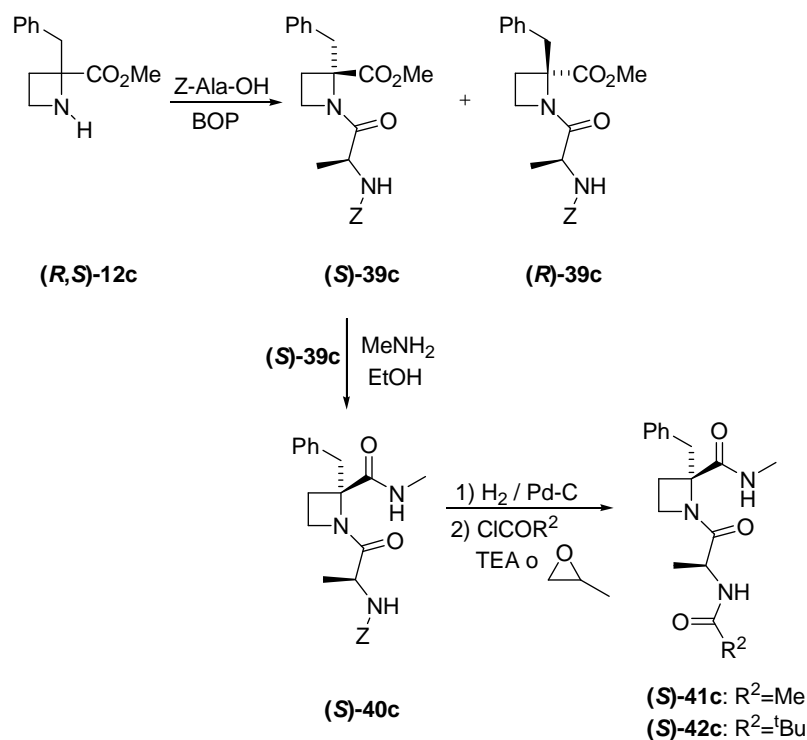


Los intentos de separación de las parejas diastereoisoméricas **(*R,S*)-41b** y **(*R,S*)-42b** mediante cromatografía resultaron infructuosos. Sin embargo, la utilización de una columna analítica quiral de HPLC permitió observar la pareja de diastereoisómeros **(*R,S*)-42b** [Piv-Ala-(*R,S*)-Aza-NHMe], mientras que no fue posible en el caso de la mezcla **(*R,S*)-41b** [Ac-Ala-(*R,S*)-Aza-NHMe].



73

únicamente con el derivado **(S)**-39c. Así, la aminólisis de **(S)**-39c condujo a la metilamida **(S)**-40c. Finalmente, la hidrogenación catalítica de **(S)**-40c y posterior *N*-acilación, condujo a los compuestos **(S)**-41c y **(S)**-42c con rendimientos en torno al 65 %.



Esquema 17

## 1.5.2. Estudios conformacionales.

### 1.5.2.1. Estudios teóricos.

A fin de evaluar la capacidad de los derivados de Azx (x= g, a) para inducir giros inversos en posición *i*+2, se realizaron estudios de modelización molecular. Para ello se eligieron modelos tetrapeptídicos sencillos, utilizando un grupo acetilo como simplificación del aminoácido de la posición *N*-terminal y un agrupamiento *N*-metilcarboxamida en *C*-terminal (Ac-Ala-Azx-NHMe), que se corresponderían con los dipéptidos **41a,b**. A efectos comparativos, se incluyeron también los correspondientes

modelos tetrapeptídicos con un residuo de Pro o  $\alpha$ -MePro (**37a,b**). La metodología aplicada al análisis conformacional fue análoga a la empleada en los estudios de los derivados con un aminoácido restringido en posición  $i+1$  (apartado 1.4.2.1). Los resultados de los estudios conformacionales se encuentran recogidos en las Figuras 14-19 y en las Tablas 8-11.

En primer lugar se analizó la existencia de isomería *cis/trans* en torno al enlace amida en el que participa el NH secundario del aminoácido conformacionalmente restringido, para lo que se midió el correspondiente ángulo diedro  $\omega$ . Es de señalar que los dipéptidos que incorporan el aminoácido conformacionalmente restringido en posición  $i+1$  poseen siempre mínimos globales con conformaciones *trans* (apartado 1.4.2.1), mientras que cuando se encuentra en posición  $i+2$  los mínimos globales pueden tener conformación *cis* o *trans*, en función de la existencia de mono- o disustitución en posición  $\alpha$  del anillo de pirrolidina o azetidina. Así, el mínimo global de los dipéptidos que contienen un grupo metilo en posición  $\alpha$  del anillo (Aza y  $\alpha$ -MePro) posee un enlace amida Ala-Xaa *trans*, mientras que el de los derivados que incorporan Pro y Azg es *cis*. Como ya se ha comentado, la presencia de un grupo alquilo en posición  $\alpha$  disminuye la población de rotámeros *cis* debido a interacciones estéricas desfavorables entre el sustituyente en dicha posición y la cadena lateral del aminoácido precedente.

A continuación se evaluó la existencia de giros inversos en las conformaciones de mínima energía (+3 Kcal/mol del mínimo global). Así, para valorar la existencia de giros  $\beta$ , se midió la distancia entre los carbonos  $\alpha$  del primer y cuarto residuo, el ángulo pseudodiedro  $\tau$  y la distancia entre el oxígeno del grupo carbonilo del primer residuo y el protón NH del cuarto. De igual forma, en la determinación de giros  $\gamma$  se midieron distancias entre el oxígeno del grupo carbonilo del segundo residuo y el protón amídico del cuarto ( $\text{CO}^{i+1}\text{-NH}^{i+3} \leq 2.5 \text{ \AA}$ ). Estos datos se representan en forma de histograma en las Figuras 14 y 15. Seguidamente, se clasificaron las diferentes conformaciones en familias teniendo en cuenta los valores de los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  de los residuos centrales del giro.

El análisis de los datos obtenidos de los estudios de dinámica molecular resultó bastante complejo. En primer lugar se analizó la distancia entre los carbonos  $\alpha\text{C}^i\text{-}\alpha\text{C}^{i+3}$  así como los valores del ángulo pseudotorsional  $\tau$  en los derivados de prolina y  $\alpha$ -metilprolina. La Figura 14A y 14C pone de manifiesto que aproximadamente un 40 %

de los conformeros del derivado de Ac-Ala-Pro-NHMe presentan distancias entre los carbonos  $\alpha$  del primer y cuarto residuo ( $\alpha C^i - \alpha C^{i+3} < 7 \text{ \AA}$ ) y valores del ángulo pseudodiedro  $\tau$  (entre  $90$  y  $-90^\circ$ ) dentro de lo esperado para conformaciones de giro  $\beta$ . Sin embargo, es de señalar que en estos conformeros el enlace amida Ala-Pro es siempre *cis* (Tabla 8), lo que indicaría un giro  $\beta$  de tipo VI, y no de tipo I o II como se obtenían en los dipéptidos con Pro en  $i+1$ . Por otra parte, para el derivado Ac-Ala- $\alpha$ -MePro-NHMe el porcentaje de conformeros capaces de cumplir estos requisitos disminuye hasta un 10 %. En este caso, junto a familias con conformeros *cis* en el enlace amida Ala- $\alpha$ -MePro, existe una familia de conformeros *trans* a 0.26 Kcal/mol del mínimo global que cumple los requisitos de giro  $\beta$  (Tabla 9). De forma general, las familias de conformeros *cis* muestran estructura de giro  $\beta$  tipo VI abierto. Como era de esperar, el derivado que incorpora Pro presenta estas conformaciones en mayor número y menor energía que el que contiene  $\alpha$ -MePro, consistente con la desestabilización que sufre el isómero *cis* por el grupo metilo en posición  $\alpha$ . Cabe destacar también que, tanto para los dipéptidos que incorporan Pro como  $\alpha$ -MePro, el mínimo global se corresponde con una familia de conformeros desestructurados.

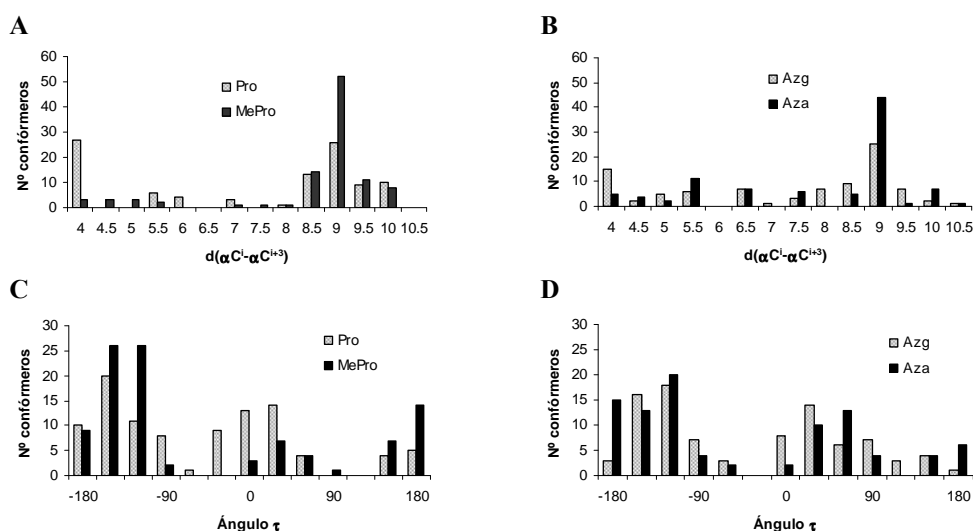


Figura 14. Distribución de las distancias  $\alpha C^i - \alpha C^{i+3}$  (Å) (A y B) y ángulo  $\tau$  (C y D) de los conformeros de mínima energía (+3 Kcal/mol del mínimo global) obtenidas tras el estudio de dinámica molecular de los dipéptidos Ac-Ala-Xaa-NHMe (Xaa= Pro,  $\alpha$ -MePro, Azg, Aza).

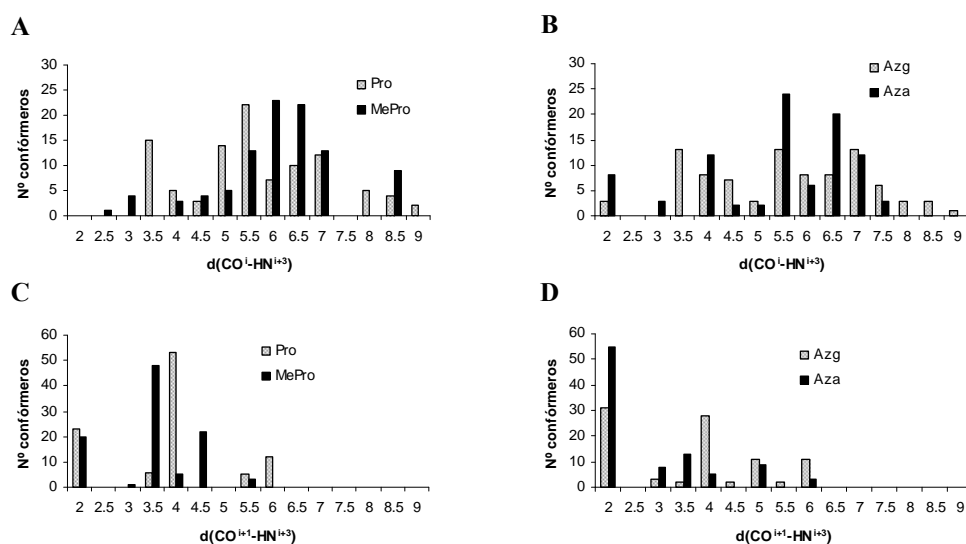


Figura 15. Distribución de las distancias (Å) correspondientes a enlace de hidrógeno intramoleculares  $\text{CO}^i\text{-NH}^{i+3}$  (A y B),  $\text{CO}^{i+1}\text{-NH}^{i+3}$  (C y D), para los conformeros de mínima energía (+3 Kcal/mol del mínimo global) obtenidas tras el estudio de dinámica molecular de los dipéptidos Ac-Ala-Xaa-NHMe (Xaa= Pro,  $\alpha$ -MePro, Azg, Aza).

Finalmente, y aunque también existen familias de conformeros en los derivados que incorporan Pro o  $\alpha$ -MePro con enlace de hidrógeno y ángulos diedros característicos de giros  $\gamma$  (Figura 15C y Tablas 8 y 9), debido a la sobreestimación en la predicción de giros  $\gamma$  de la modelización molecular<sup>62,102</sup>, junto a los antecedentes bibliográficos que indican la predisposición de los derivados de prolina en posición  $i+2$  para la formación de giros  $\beta$  de tipo VI<sup>53</sup>, estos datos han de analizarse con cautela. En las Figuras 16 y 17 se encuentran recogidas las familias más representativas de los derivados Ac-Ala-Pro-NHMe y Ac-Ala- $\alpha$ -MePro-NHMe, respectivamente.

Tabla 8. Parámetros topográficos más relevantes para los conformeros de mínima energía de Ac-Ala-Pro-NHMe (**37a**).

CONF.	$\Delta E$ (Kcal/mol)	$\omega$	$\phi_{i+1}$	$\psi_{i+1}$	$\phi_{i+2}$	$\psi_{i+2}$	$d(\text{CO}^i\text{-NH}^{i+3})$	$d(\text{CO}^{i+1}\text{-NH}^{i+3})$	$d(\alpha\text{C}^i\text{-}\alpha\text{C}^{i+3})$
<b>37a-1</b>	0	1.9	-143.0	85.7	-73.7	156.4	3.59	5.84	3.94
<b>37a-2</b>	0.24	-2.0	-155.0	76.5	-75.9	-40.8	5.60	3.95	4.13
<b>37a-3</b>	0.27	-178.0	-139.0	74.7	-78.2	71.2	6.83	2.05	9.29
<b>37a-4</b>	0.31	-179.0	-69.6	143.9	-77.3	71.6	5.52	2.04	8.46
<b>37a-5</b>	0.41	-178.0	54.3	67.7	-77.5	71.8	5.11	2.04	8.97
<b>37a-6</b>	0.48	0.5	-68.8	139.2	-75.5	-41.5	3.39	3.99	5.73
<b>37a-7</b>	0.67	4.0	60.8	82.6	-70.9	-49.6	4.56	4.19	3.92
<b>37a-8</b>	0.67	-0.9	-153.0	93.4	-60.3	145.2	3.76	5.69	4.07
<b>37a-9</b>	0.69	-179.0	-157.0	148.8	-77.1	71.6	6.83	2.04	8.68
<b>37a-10</b>	0.84	-178.0	-128.0	72.4	-69.9	-44.7	5.72	3.85	9.09
<b>37a-11</b>	0.88	-179.0	-70.1	143.3	-69.3	-44.2	6.31	3.81	9.08
<b>37a-12</b>	1.05	-178.0	54.1	64.2	-69.2	-44.6	6.21	3.82	9.04
<b>37a-13</b>	1.16	-179.0	-69.8	142.9	-72.4	154.3	6.82	4.16	9.43
<b>37a-14</b>	1.17	-179.0	-130.0	72.3	-73.2	154.8	8.22	4.18	9.91
<b>37a-15</b>	1.21	-179.0	-157.0	147.6	-69.1	-44.3	6.90	3.82	9.20
<b>37a-16</b>	1.28	-179.0	54.1	64.2	-72.3	152.6	6.42	4.12	9.53
<b>37a-17</b>	1.30	-0.4	-76.7	135.4	-76.9	135.8	4.10	5.50	5.88
<b>37a-18</b>	1.52	179.4	-156.0	147.2	-72.3	155.0	8.78	4.18	9.87
<b>37a-19</b>	2.04	179.8	71.2	146.2	-77.4	71.1	4.34	2.04	7.94

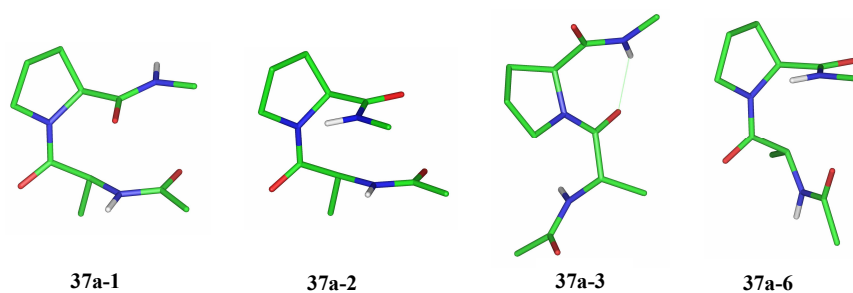


Figura 16. Conformerros de mínima energía representativos para Ac-Ala-Pro-NHMe (**37a**).

Tabla 9. Parámetros topográficos más relevantes para los conformeros de mínima energía de Ac-Ala- $\alpha$ -MePro-NHMe (**37b**).

CONF.	$\Delta E$ (Kcal/mol)	$\omega$	$\phi_{i+1}$	$\psi_{i+1}$	$\phi_{i+2}$	$\psi_{i+2}$	$d(\text{CO}^i\text{-NH}^{i+3})$	$d(\text{CO}^{i+1}\text{-NH}^{i+3})$	$d(\alpha\text{C}^i\text{-}\alpha\text{C}^{i+3})$
<b>37b-1</b>	0	179.8	-146.0	81.8	-52.0	-46.5	6.30	3.47	9.24
<b>37b-2</b>	0.02	-178.0	-68.3	141.2	-74.6	-65.4	5.43	1.97	8.44
<b>37b-3</b>	0.07	-176.0	52.9	64.4	-74.8	65.7	5.05	1.97	8.92
<b>37b-4</b>	0.09	-177.0	-140.0	70.5	-75.1	65.1	6.72	1.98	9.23
<b>37b-5</b>	0.26	175.9	-53.8	-44.0	-52.8	-36.7	2.34	3.22	5.64
<b>37b-6</b>	0.31	-179.0	54.3	74.5	-51.9	-46.3	6.12	3.44	8.99
<b>37b-7</b>	0.35	177.7	-67.8	120.0	-50.4	-46.2	5.94	3.43	8.89
<b>37b-8</b>	0.50	-179.0	-157.0	145.8	-74.3	65.4	6.76	1.97	8.68
<b>37b-9</b>	0.84	-178.0	-68.4	140.0	-68.7	171.5	7.00	4.57	9.60
<b>37b-10</b>	0.87	179.3	-146.0	83.1	-55.6	164.5	8.62	4.42	10.03
<b>37b-11</b>	0.91	-177.0	52.8	60.5	-68.4	171.0	6.66	4.56	9.57
<b>37b-12</b>	0.92	-178.0	-157.0	144.8	-63.4	-41.0	6.78	3.58	9.03
<b>37b-13</b>	1.15	-179.0	54.3	75.2	-55.2	160.2	6.53	4.33	9.44
<b>37b-14</b>	1.51	0.29	-152.0	106.5	-50.9	-45.7	4.61	3.88	3.77
<b>37b-15</b>	1.88	175.2	-157.0	154.7	-52.7	158.1	8.88	4.27	9.52
<b>37b-16</b>	1.90	-179.0	-64.6	-43.9	-56.2	159.7	6.55	4.29	8.08
<b>37b-17</b>	2.18	0.0	-157.0	98.1	-50.5	138.8	4.04	5.65	4.38
<b>37b-18</b>	2.46	3.7	-58.6	134.7	-67.3	-42.9	2.92	3.96	5.36
<b>37b-19</b>	2.53	-175.0	-160.0	-49.5	-55.3	-46.0	6.11	3.48	7.09
<b>37b-20</b>	2.75	176.9	-160.0	-68.1	-65.5	168.4	8.84	4.47	8.43

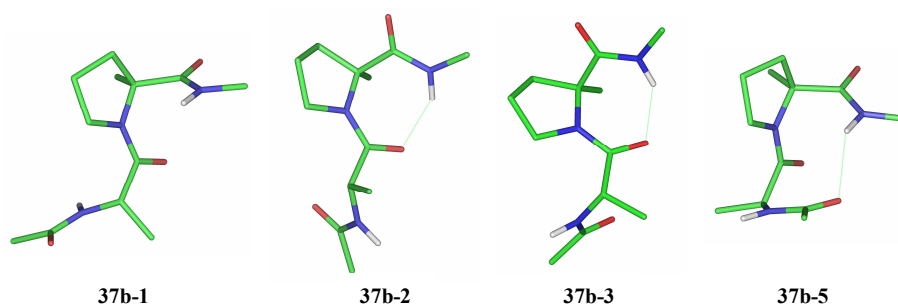


Figura 17. Conformeros de mínima energía representativos para Ac-Ala- $\alpha$ -MePro-NHMe (**37b**).

Por otra parte, el análisis de los datos de los estudios de dinámica molecular para los dipéptidos que incorporan derivados de azetidina-2-carboxilato, mostró que aproximadamente un 30 % de conformeros de Ac-Ala-Azx-NHMe presentan ángulo  $\tau$  y distancia entre los carbonos  $\alpha$  del primer y cuarto residuo, adecuados para la formación de giros  $\beta$  (Figura 14B y 14D). Así, se observan familias con enlace amida *cis* que presentan ángulos diedros de los residuos centrales dentro de lo esperado para giros  $\beta$  de tipo VI ( $\pm 30^\circ$ ) con la flexibilidad adicional de  $45^\circ$  para un ángulo, si bien no muestran el enlace de hidrógeno característico de estos giros. En el caso de la incorporación de un residuo de Aza **41b**, estas familias son de mayor energía que para las que poseen Azg **41a**. Además, en el derivado **41b** existe una familia de conformeros *trans* con giro  $\beta$  tipo I (familia **41b-5**, aunque sus ángulos diedros se aproximan más al extinto tipo III o a una hélice  $3_{10}$ ). Sin embargo, como se puede observar en la Figura 15D, existe un aumento sensible en las poblaciones conformacionales de Ac-Ala-Azx-NHMe ( $x = g, a$ ) que presentan el enlace de hidrógeno intramolecular característico de giro  $\gamma$ , con respecto de los derivados de Pro y  $\alpha$ -MePro. Este aumento es más acentuado en los dipéptidos que incorporan 2-metilazetidina, y se corresponden a familias de menor energía. Además, el mínimo global del derivado de 2-metilazetidina se corresponde con una conformación de giro  $\gamma$ . En las Tablas 10 y 11 se recogen los principales parámetros topográficos de los conformeros de mínima energía para los derivados dipeptídicos con Azx en posición  $i+2$ , mientras que a modo de ejemplo, las Figuras 18 y 19 muestran las familias más representativas de conformeros para estos derivados.

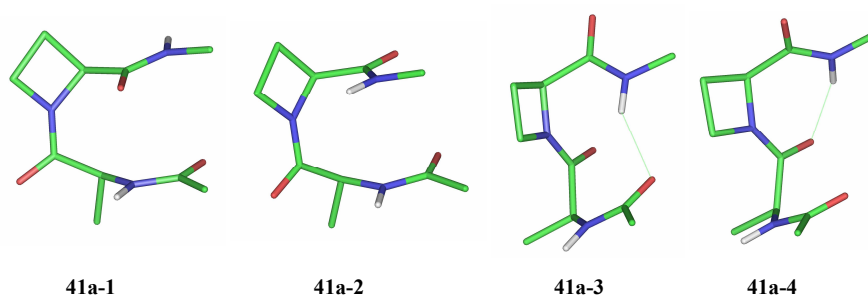


Figura 18. Conformeros de mínima energía para Ac-Ala-Azg-NHMe (**41a**).



Tabla 10. Parámetros topográficos más relevantes para los conformeros de mínima energía de Ac-Ala-Azg-NHMe (**41a**).

CONF.	$\Delta E$ (Kcal/mol)	$\omega$	$\phi_{i+1}$	$\psi_{i+1}$	$\phi_{i+2}$	$\psi_{i+2}$	$d(\text{CO}^i\text{-NH}^{i+3})$	$d(\text{CO}^{i+1}\text{-NH}^{i+3})$	$d(\alpha\text{C}^i\text{-}\alpha\text{C}^{i+3})$
<b>41a-1</b>	0	3.2	-142.0	83.4	-68.4	85.4	3.62	5.83	4.01
<b>41a-2</b>	0.08	3.5	-141.0	91.9	-65.8	-41.5	4.65	3.97	3.80
<b>41a-3</b>	0.35	173.2	-50.6	-50.0	-56.5	41.3	2.17	3.22	5.34
<b>41a-4</b>	0.36	-177.0	-61.6	-46.0	-68.8	115.8	4.03	1.99	6.65
<b>41a-5</b>	0.38	-174.0	-70.7	120.7	-70.7	-79.8	5.55	2.01	8.79
<b>41a-6</b>	0.42	5.3	53.9	65.1	-79.3	-74.6	4.04	4.32	3.87
<b>41a-7</b>	0.51	-175.0	-118.0	82.2	-69.6	-122.0	6.53	2.01	9.21
<b>41a-8</b>	0.53	5.0	-68.9	133.7	-72.5	-38.6	3.28	4.16	5.66
<b>41a-9</b>	0.71	-174.0	55.0	67.6	-69.9	-138.0	5.00	2.01	8.92
<b>41a-10</b>	0.76	7.3	-75.3	-35.3	-66.5	-161.0	6.30	4.35	6.69
<b>41a-11</b>	0.85	4.6	55.7	73.0	-68.8	73.5	5.73	5.58	4.20
<b>41a-12</b>	0.87	-175.0	-157.0	153.9	-69.9	-38.3	6.82	2.01	8.74
<b>41a-13</b>	1.05	-179.0	-72.3	117.2	-62.3	-168.0	5.92	3.79	9.28
<b>41a-14</b>	1.12	178.9	-115.0	78.6	-60.8	147.9	5.57	3.78	9.15
<b>41a-15</b>	1.44	-179.0	55.1	64.3	-62.0	132.5	6.23	3.78	9.07
<b>41a-16</b>	1.46	178.9	-156.0	150.6	-61.1	-126.0	6.86	3.77	9.21
<b>41a-17</b>	1.47	3.0	-146.0	78.4	-70.0	-52.6	4.50	4.01	4.99
<b>41a-18</b>	1.57	-177.0	-158.0	-52.0	-69.0	112.1	6.52	2.00	7.64
<b>41a-19</b>	1.57	3.3	-155.0	148.3	-69.7	-33.5	5.64	4.04	6.68
<b>41a-20</b>	1.59	-179.0	-116.0	80.3	-64.8	-34.5	7.74	4.86	9.92
<b>41a-21</b>	1.84	-179.0	55.0	64.8	-65.2	-57.0	6.83	4.80	9.60
<b>41a-22</b>	1.92	179.9	-156.0	151.6	-65.1	47.9	9.04	4.84	10.3
<b>41a-23</b>	1.98	-178.0	-66.8	-44.9	-68.6	117.5	5.84	1.99	4.81
<b>41a-24</b>	2.04	-174.0	69.4	155.9	-71.6	-37.1	4.37	2.01	7.89
<b>41a-25</b>	2.12	2.9	-155.0	147.9	-70.6	94.4	4.82	5.59	6.89
<b>41a-26</b>	2.23	175.0	-69.2	-50.4	-57.7	27.8	3.84	3.71	4.30
<b>41a-27</b>	2.29	-174.0	-139.0	76.8	-70.6	-128.0	7.18	2.02	8.48
<b>41a-28</b>	2.53	-178.0	-71.6	118.6	-66.7	5.8	7.79	5.03	8.90
<b>41a-29</b>	2.67	178.8	-65.1	-49.1	-63.8	-166.0	6.11	4.97	8.18
<b>41a-30</b>	2.74	-179.0	-71.5	117.4	-63.0	-49.7	7.44	4.18	7.60
<b>41a-31</b>	2.74	176.8	-63.0	-50.6	-59.9	145.1	5.42	4.14	7.84
<b>41a-32</b>	2.86	178.8	-116.0	79.1	-61.4	-93.4	8.18	4.17	8.19
<b>41a-33</b>	2.94	178.7	-76.0	143.0	-60.3	-134.0	7.54	3.75	8.04
<b>41a-34</b>	2.98	-178.0	-139.0	73.6	-63.3	141.8	7.05	3.82	7.94

Tabla 11. Parámetros topográficos más relevantes para los conformeros de mínima energía de Ac-Ala-(S)-Aza-NHMe (**41b**).

CONF.	$\Delta E$ (Kcal/mol)	$\omega$	$\phi_{i+1}$	$\psi_{i+1}$	$\phi_{i+2}$	$\psi_{i+2}$	$d(\text{CO}^i\text{-NH}^{i+3})$	$d(\text{CO}^{i+1}\text{-NH}^{i+3})$	$d(\alpha\text{C}^i\text{-}\alpha\text{C}^{i+3})$
<b>41b-1</b>	0	-174.0	-68.8	119.4	-69.9	55.1	5.49	1.98	8.78
<b>41b-2</b>	0.05	-179.0	-61.0	-47.2	-67.9	54.2	3.88	1.97	6.52
<b>41b-3</b>	0.20	-176.0	-118.0	81.4	-68.6	55.2	6.47	1.99	9.19
<b>41b-4</b>	0.29	-174.0	53.9	66.3	-69.5	55.3	4.99	1.98	8.91
<b>41b-5</b>	0.39	174.0	-50.8	-50.0	-58.4	-24.2	2.12	3.12	5.32
<b>41b-6</b>	0.60	-177.0	-156.0	152.6	-68.7	55.1	6.77	1.98	8.73
<b>41b-7</b>	1.11	-179.0	-70.5	116.2	-62.2	-44.4	5.84	3.72	9.23
<b>41b-8</b>	1.21	-177.0	-69.6	118.5	-68.4	-167.0	6.83	5.12	9.97
<b>41b-9</b>	1.22	0.8	-65.8	134.9	-65.4	-48.6	3.13	4.07	5.52
<b>41b-10</b>	1.24	178.2	-115.0	77.9	-60.3	-44.7	5.50	3.72	9.10
<b>41b-11</b>	1.33	-178.0	-159.0	-53.6	-67.8	56.4	6.43	1.97	7.52
<b>41b-12</b>	1.38	-179.0	-117.0	80.6	-67.0	-167.0	7.63	5.12	9.93
<b>41b-13</b>	1.47	-3.0	-147.0	88.4	-55.6	141.8	3.79	5.79	4.04
<b>41b-14</b>	1.47	-179.0	54.0	63.1	-62.1	-44.4	6.15	3.72	9.02
<b>41b-15</b>	1.56	-177.0	54.0	64.8	-68.1	-168.0	7.05	5.12	9.64
<b>41b-16</b>	1.62	177.7	-156.0	149.6	-60.4	-44.2	6.77	3.70	9.14
<b>41b-17</b>	1.77	-179.0	-156.0	151.7	-67.1	-167.0	9.09	5.12	10.45
<b>41b-18</b>	2.34	174.3	-69.7	-51.3	-57.7	-44.2	3.77	3.70	4.24
<b>41b-19</b>	2.71	-3.5	-147.0	80.8	-58.9	-45.6	4.42	3.90	4.87

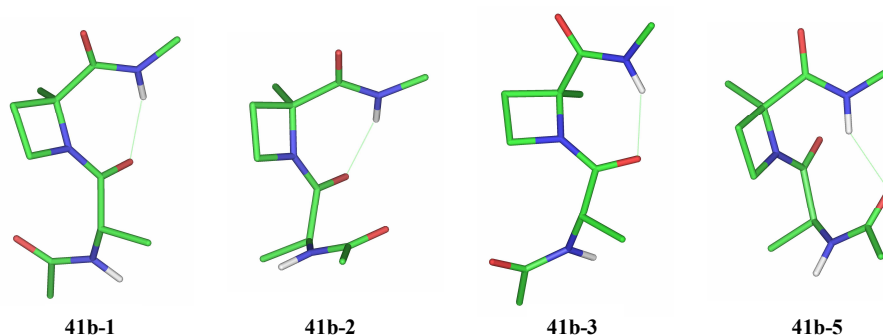


Figura 19. Conformeros de mínima energía representativos para Ac-Ala-(S)-Aza-NHMe (**41b**).

Como conclusión, los estudios de modelización molecular parecen sugerir que los derivados de 2-alkil-2-carboxiazetidina en posición i+2 de la cadena peptídica son

también capaces de estabilizar giros  $\gamma$ . Sin embargo, estos datos teóricos necesitan apoyarse en estudios experimentales para confirmarse.

#### 1.5.2.2. Estudios de IR.

Para evaluar la presencia de enlaces de hidrógeno, de manera análoga a lo indicado en el apartado 1.4.2.2, se han estudiado las bandas de tensión de NH (amida A) que absorben en dos regiones,  $3460\text{--}3410\text{ cm}^{-1}$  y  $3380\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a NH libres y con enlace de hidrógeno, respectivamente. Con excepción del dipéptido que contiene prolina **36a**, la forma y frecuencia de las bandas pertenecientes a NH no varía con la concentración, lo cual indica que no se observan efectos de agregación intermolecular en estos dipéptidos. Por otra parte, el derivado dipeptídico (**R,S**)-**40b** [Z-Ala-(**R,S**)-Aza-NHMe] presenta únicamente una banda muy ancha con un máximo a  $3401\text{ cm}^{-1}$ , que engloba las dos bandas de NH objeto de estudio.

Los espectros de FT-IR del resto de derivados dipeptídicos estudiados muestran, al igual que en el caso de dipéptidos R-CO-Xaa-Ala-NHMe, equilibrio entre formas libres y asociadas. Sin embargo, y a diferencia con los derivados que incorporaban el aminoácido conformacionalmente restringido en posición *i*+1, los derivados con un resto de pivaloilo o acetilo en el extremo *N*-terminal, muestran intensidades similares en la banda de NH asociado. Por otra parte, se observa una disminución de esta banda para los derivados que presentan un grupo benciloxycarbonilo *N*-terminal.

A modo de ejemplo, en la Figura 20 se recogen los espectros de FT-IR de los derivados dipeptídicos que poseen un grupo pivaloilo *N*-terminal. Como se observa en la Figura 20, los dipéptidos que contienen un anillo de Pro o  $\alpha$ -MePro muestran una banda más intensa de NH libre que de NH con enlace de hidrógeno, mientras que los compuestos que incorporan derivados de azetidina presentan intensidades relativas de las bandas de NH similares. Esto sugiere que los dipéptidos que incorporan un residuo de azetidina en posición *i*+2 son capaces de formar enlaces de hidrógeno intramoleculares con más facilidad que los que incorporan prolina.

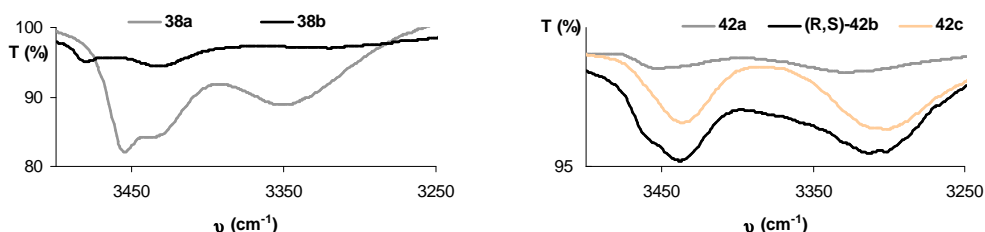


Figura 20. Región de la tensión NH de los espectros de FT-IR de los derivados dipeptídicos Piv-Ala-Xaa-NHMe (**38a**: Xaa=Pro, **38b**: Xaa= $\alpha$ -MePro, **42a**: Xaa=Azg, **42b**: Xaa=Aza, **42c**: Xaa=Azf).

### 1.5.2.3. Estudios de RMN.

El estudio conformacional de los derivados dipeptídicos **36-38** y **40-42** en disolución se completó mediante  $^1\text{H}$  RMN. Los espectros de algunos de estos dipéptidos presentan parejas de señales homólogas debido a rotamería *cis/trans* en torno al enlace amida Ala-Xaa (Tabla 12). Como era de esperar, el aumento de polaridad del disolvente conlleva un aumento de los rotámeros *cis*. Aunque los derivados dipeptídicos (**R,S**)-**40b**-(**R,S**)-**42b** presentaban duplicidad de señales, la intensidad de éstas no variaba con el cambio de disolvente ni se observó coalescencia en los estudios de temperatura, por lo que fueron atribuidas a la presencia de dos diastereoisómeros en cada caso. La asignación de las conformaciones *cis/trans* del enlace amida Ala-Xaa se realizó siguiendo los mismos criterios utilizados en el apartado 1.4.2.3 (página 61)<sup>57,135,139,140</sup>. En función del derivado dipeptídico objeto de estudio se pudieron aplicar uno o varios de dichos criterios.

El rotámero mayoritario de los dipéptidos que incorporan Pro (**36a-38a**) y Azg (**40a-42a**) fue asignado como *trans* en base a criterios de anisotropía. Así, la señal correspondiente al carbono  $\alpha$ -Pro o 2-C de Azg de los confórmeros *trans* se encuentra más apantallada que la correspondiente señal del confórmero *cis*. Por el contrario, los rotámeros *cis* muestran la señal correspondiente al carbono  $\delta$ -Pro ó 4-C de Azg más apantallada que la del rotámero *trans*. Además, los derivados dipeptídicos **36a-38a** mostraban un  $\Delta\delta$  entre los carbonos  $\beta$  y  $\gamma$  de prolina para los rotámeros mayoritarios de 4.0-2.0 ppm, valor dentro del rango establecido para rotámeros *trans*, mientras que sus isómeros minoritarios presentaban un  $\Delta\delta_{\beta\gamma}$  de 9.1-9.6 ppm, indicativo de rotámeros *cis*.

Los derivados dipeptídicos **36b-38b**, y **42c** carecen de rotamería *cis/trans* por lo que no se pudo aplicar el criterio de anisotropía. Además, debido a que los compuestos

**36b-38b** poseen disustitución en posición  $\alpha$  del anillo de prolina, tampoco fue posible aplicarles la regla empírica del  $\Delta\delta_{\beta\gamma}$ . La conformación en disolución de estos dipéptidos (**36b-38b**, y **42c**) se asignó como *trans* mediante la utilización de experimentos 2D tipo NOESY. En ellos se observa correlación espacial entre el protón  $\alpha$  del residuo de alanina y los protones H-4 o  $\delta$  del anillo de azetidina o prolina, respectivamente. Esta correlación espacial no se observó para el único rotámero presente en los dipéptidos Z-Ala-Azf-NHMe (**40c**) y Ac-Ala-Azf-NHMe (**41c**). Sin embargo, y en base a la alta tendencia de las 2-alkilazetidinas para adoptar conformaciones *trans*, la conformación de los rotámeros de **40c** y **41c** se asignó tentativamente como *trans*.

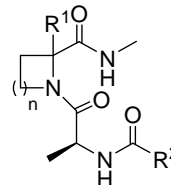
Finalmente, debido a la superposición de señales en los espectros de RMN de las parejas de diastereoisómeros (**R,S**)-**40b**-(**R,S**)-**42b**, tampoco pudo determinarse la conformación del rotámero mayoritario mediante la utilización de experimentos bidimensionales NOESY o ROESY, por lo que se asignaron tentativamente como *trans*, por homología con el resto de derivados en esta serie. La complejidad de estos espectros no permitió la asignación inequívoca de la configuración *R* o *S* en el carbono 2 del residuo de Aza de cada diastereoisómero. Por lo tanto, y aunque en las sucesivas Tablas de RMN aparezca una línea correspondiente al diastereoisómero R<sup>2</sup>-Ala-(*R*)-Aza-NHMe y otra para R<sup>2</sup>-Ala-(*S*)-Aza-NHMe, los datos pueden estar intercambiados. Hay que señalar que el comportamiento de ambos diastereoisómeros en relación a desplazamiento químico y coeficientes de temperatura es muy similar.

En la Tabla 12 se encuentra recogido el porcentaje de rotamería *cis* en CDCl<sub>3</sub> y DMSO-d<sub>6</sub> de los derivados **36-38**, **40-42**. De manera análoga a lo observado para los derivados dipeptídicos de fórmula general R<sup>2</sup>-CO-Xaa-Ala-NHMe descritos en el apartado anterior, en general, la población de conformeros *cis* en los derivados R<sup>2</sup>-CO-Ala-Xaa-NHMe aumenta moderadamente al aumentar la polaridad del disolvente. Paralelamente, también se ha observado una estabilización del enlace peptídico Ala-Xaa *trans* por la presencia de un sustituyente (R<sup>1</sup>) en el carbono  $\alpha$  del residuo de 2-carboxiazetidina o prolina<sup>134,136</sup>. Esta estabilización del rotámero *trans* se ha atribuido a interacciones estéricas desfavorables en el isómero *cis* entre dicho sustituyente R<sup>1</sup> y la cadena lateral del aminoácido precedente<sup>134,136</sup>. De hecho, los derivados de  $\alpha$ -metilprolina o  $\alpha$ -bencilazetidina no presentaron rotamería *cis/trans* en ninguno de los disolventes estudiados. Además, se observa una disminución del porcentaje de rotámero *cis* a medida

que aumenta el sustituyente en  $\alpha$ . Así, para los dipéptidos que contienen un residuo de Azx el orden es Azg > Aza > Azf.

Tabla 12. Proporción de rotámeros de derivados dipeptídicos  $R^2$ -Ala-Xaa-NHMe en  $CDCl_3$  y  $DMSO-d_6$ .

Cpto.	n	$R^1$	$R^2$	% <i>Cis</i>	
				$CDCl_3$	$DMSO-d_6$
36a	2	H	OBn	17	19
37a			Me	25	29
38a			<sup>t</sup> Bu	17	25
36b		Me	OBn	0	0
37b			Me	0	0
38b			<sup>t</sup> Bu	0	0
40a	1	H	OBn	15	25
41a			Me	28	37
42a			<sup>t</sup> Bu	13	24
40b <sup>a</sup>		Me	OBn	0	<5
41b <sup>a</sup>			Me	<5	14
42b <sup>a</sup>			<sup>t</sup> Bu	0	10
40c		Bn	OBn	0	0
41c			Me	0	0
42c			<sup>t</sup> Bu	0	0



<sup>a</sup>Las proporciones de rotámeros son similares en los dos diastereoisómeros de la mezcla y, dada la complejidad de los espectros, son una estimación aproximada.

Es de señalar que la rotamería observada para los derivados *N*-pivaloil sustituidos (38a, 42a) es comparable a la que muestran sus análogos con un resto benciloxycarbonilo (36a, 40a) o acetilo (37a, 41a) en el extremo *N*-terminal. Estos datos indican que la influencia del sustituyente  $R^2$  en el equilibrio *cis/trans* es nula en los derivados con un residuo de prolina o azetidina en posición *i*+2, ya que el sustituyente  $R^2$  no se encuentra directamente unido al enlace amida implicado en la rotamería, a diferencia de lo que ocurría en los derivados dipeptídicos que contenían un anillo conformacionalmente restringido en posición *i*+1.

A continuación se evaluó la capacidad de los derivados de prolina y 2-carboxiazetidina de esta segunda serie para inducir giros inversos. Con este fin se estudió la posible existencia de enlaces de hidrógeno característicos de estos giros, utilizando los mismos criterios que en el apartado 1.4.2.3, analizando los desplazamientos químicos de protón y los coeficientes de temperatura de los NH amídicos<sup>57,131</sup>. Las Tablas 13 y 14 recogen los valores de estos parámetros para los rotámeros *trans* y *cis*, respectivamente, de los derivados dipeptídicos **36-38**, **40-42**.

En la Tabla 13 se observa que, con excepción del derivado **41c**, el desplazamiento químico del protón amídico del residuo de Ala en estos dipéptidos es inferior a 7 ppm. Este dato junto con la variación de  $\delta$  observada entre CDCl<sub>3</sub> y DMSO-d<sub>6</sub> y los coeficientes de temperatura superiores a 5 ppb/K en todos los casos, es indicativo de la exposición al disolvente de este NH en los rotámeros *trans*. Por otra parte, el comportamiento del protón amídico del agrupamiento NH-Me varía en función del aminoácido conformacionalmente restringido incorporado al dipéptido, Pro o Azx. Así, el bajo valor de desplazamiento químico de este NH en CDCl<sub>3</sub>, y valores de coeficiente de temperatura superiores a 4 ppb/K (en valor absoluto) pone de manifiesto que los cónformeros *trans* de los derivados de Pro y  $\alpha$ -MePro (**36a,b-38a,b**) tampoco presentan protección al disolvente para el NH-Me. Por el contrario, para los derivados que incorporan un residuo de 2-carboxiazetidina se observan valores de desplazamiento químico para el protón amida NH-Me superiores a 7 ppm. Si se examina la variación de  $\delta$  al cambiar el disolvente a DMSO-d<sub>6</sub> se puede observar que existen, dentro de los derivados de azetidina, dos grupos diferenciados. En primer lugar, los derivados dipeptídicos que incorporan Azg (**40a-42a**) presentan un  $\Delta\delta$  al cambiar de CDCl<sub>3</sub> a DMSO-d<sub>6</sub> en torno a 0.5 ppm, mientras que los derivados de 2-alkil-2-carboxiazetidina sólo muestran una mínima variación de este desplazamiento químico (0.04-0.27 ppm). Este distinto comportamiento se observa también en los valores de los coeficientes de temperatura del protón amídico del agrupamiento NH-Me. Así, para los péptidos que incorporan Azg (**40a-42a**) este valor es igual o mayor a 4 ppb/K, lo que sugiere ausencia de enlace de hidrógeno intramolecular en estos derivados, en consonancia con los valores de  $\Delta\delta$  para este NH observados al cambiar de CDCl<sub>3</sub> a DMSO-d<sub>6</sub>.

Tabla 13. Desplazamientos químicos y coeficientes de temperatura para los protones NH de los rotámeros *trans* de los dipéptidos R<sup>2</sup>-Ala-Xaa-NHMe.

Compuesto		$\delta$ NH-Ala (ppm)		$\delta$ NH-Me (ppm)		$\Delta\delta/\Delta T^a$	$\Delta\delta/\Delta T^a$
		CDCl <sub>3</sub>	DMSO	CDCl <sub>3</sub>	DMSO	NH-Ala	NH-Me
Z-Ala-Pro-NHMe	<b>36a</b>	5.65	7.50	6.74	7.69	-6.8	-4.4
Ac-Ala-Pro-NHMe	<b>37a</b>	6.37	8.11	6.61	7.69	-5.3	-4.4
Piv-Ala-Pro-NHMe	<b>38a</b>	6.52	7.46	6.62	7.70	-5.0	-4.3
Z-Ala-MePro-NHMe	<b>36b</b>	5.59	7.47	6.79	7.32	-7.0	-4.3
Ac-Ala-MePro-NHMe	<b>37b</b>	6.49	8.08	6.54	7.31	-6.5	-4.3
Piv-Ala-MePro-NHMe	<b>38b</b>	6.54	7.42	6.68	7.28	-6.0	-4.2
Z-Ala-Azg-NHMe	<b>40a</b>	5.41	7.57	7.32	7.81	-6.2	-4.7
Ac-Ala-Azg-NHMe	<b>41a</b>	6.30	8.17	7.31	7.86	-5.8	-4.4
Piv-Ala-Azg-NHMe	<b>42a</b>	6.22	7.50	7.29	7.84	-5.3	-4.0
Z-Ala-(S)-Aza-NHMe	<b>(S)-40b<sup>b</sup></b>	5.42	7.59	7.87	7.75	-6.8	<b>-2.9</b>
Z-Ala-(R)-Aza-NHMe	<b>(R)-40b<sup>b</sup></b>	5.42	7.66	7.93	7.66	-6.5	<b>-1.7</b>
Ac-Ala-(S)-Aza-NHMe	<b>(S)-41b<sup>b</sup></b>	6.42	8.16	7.83	7.78	-5.3	<b>-2.3</b>
Ac-Ala-(R)-Aza-NHMe	<b>(R)-41b<sup>b</sup></b>	6.48	8.24	7.83	7.78	-5.2	<b>-2.3</b>
Piv-Ala-(S)-Aza-NHMe	<b>(S)-42b<sup>b</sup></b>	6.32	7.55	7.86	7.82	-5.9	<b>-3.0</b>
Piv-Ala-(R)-Aza-NHMe	<b>(R)-42b<sup>b</sup></b>	6.25	7.73	7.86	7.73	-5.9	<b>-1.6</b>
Z-Ala-Azf-NHMe	<b>40c</b>	5.44	7.61	8.09	7.98	-7.0	<b>-2.0</b>
Ac-Ala-Azf-NHMe	<b>41c</b>	7.22	8.18	8.14	8.04	-5.8	<b>-2.1</b>
Piv-Ala-Azf-NHMe	<b>42c</b>	6.49	7.49	8.16	8.04	-5.8	<b>-2.3</b>

<sup>a</sup> Valores en ppb/K.  $\Delta\delta$  medido en DMSO-d<sub>6</sub>, 30-60 °C, a intervalos de 5 °C. <sup>b</sup> Los datos de RMN indicados como (S) o (R) pueden estar intercambiados.

Por el contrario, el valor de  $\Delta\delta/\Delta T$  para los derivados que contienen Aza y Azf es inferior a 3 ppb/K (en valor absoluto), indicativo de protección al disolvente de dicho protón amídico y, por tanto, de la posible existencia de un enlace de hidrógeno intramolecular para estos compuestos. Como era de esperar, la formación de este enlace en estos dipéptidos es independiente de la naturaleza del sustituyente *N*-terminal.

Debido a que la prolina en posición i+2 tiene tendencia a inducir giros  $\beta$  de tipo VI<sup>53</sup> y que estas conformaciones han sido detectadas en los estudios de modelización molecular realizados, se analizaron las conformaciones minoritarias *cis* de estos derivados



dipeptídicos. Como se refleja en la Tabla 12, solamente los derivados de Pro, Azg y en menor medida Aza mostraron rotamería *cis/trans* en torno al enlace amida Ala-Xaa cuando el disolvente es DMSO- $d_6$ . El estudio de los conformeros *cis* de estos dipéptidos puso de manifiesto que, al igual que en los conformeros *trans*, el NH-Ala no se encuentra protegido al disolvente (Tabla 14). Por otra parte, aunque el desplazamiento químico del protón amida C-terminal (NH-Me) es superior a 7 ppm en los rotámeros *cis*, existe un marcado incremento, en general, en el valor de desplazamiento químico al cambiar el disolvente de  $CDCl_3$  a DMSO- $d_6$ . En cuanto a los coeficientes de temperatura, tan sólo el valor de  $\Delta\delta/\Delta T$  para el compuesto **36a** es indicativo de posible existencia de enlace de hidrógeno, aunque este dato no está apoyado por el valor de  $\Delta\delta$  ( $CDCl_3$ -DMSO- $d_6$ ). Por otra parte, los dipéptidos **37a**, **38a**, **42a** y uno de los diastereoisómeros de **42b** poseen valores de coeficiente de temperatura en el rango de incertidumbre. De entre ellos, solamente el compuesto **38a** posee un valor relativamente bajo de  $\Delta\delta$  (0.34 ppm). Estos datos sugieren, junto con los de los estudios de modelización molecular, que el grupo NH-Me del rotámero *cis* del derivado **38a** podría estar implicado en un giro  $\beta$  de tipo VI.

Tabla 14. Desplazamientos químicos y coeficientes de temperatura para protones NH de los rotámeros *cis* de los dipéptidos R<sup>2</sup>-Ala-Xaa-NHMe.

Compuesto	$\delta$ NH-Ala (ppm)		$\delta$ NH-Me (ppm)		$\Delta\delta/\Delta T^a$	$\Delta\delta/\Delta T^a$
	$CDCl_3$	DMSO	$CDCl_3$	DMSO	NH-Ala	NH-Me
Z-Ala-Pro-NHMe <b>36a</b>	5.65	7.16	7.17	8.03	-7.3	<b>-3.0</b>
Ac-Ala-Pro-NHMe <b>37a</b>	6.11	8.06	7.46	7.98	-5.8	<b>-3.8</b>
Piv-Ala-Pro-NHMe <b>38a</b>	5.98	7.27	7.69	8.03	-4.8	<b>-3.3</b>
Z-Ala-Azg-NHMe <b>40a</b>	5.41	7.35	7.32	8.11	-4.4	-4.6
Ac-Ala-Azg-NHMe <b>41a</b>	6.49	8.17	8.21	8.37	<i>nd</i>	-4.5
Piv-Ala-Azg-NHMe <b>42a</b>	6.22	7.31	7.29	7.71	-5.7	<b>-3.7</b>
Ac-Ala-(S)-Aza-NHMe <b>(S)-41b<sup>b</sup></b>	-	8.28	-	8.63	-5.8	-4.7
Ac-Ala-(R)-Aza-NHMe <b>(R)-41b<sup>b</sup></b>	-	8.06	-	7.97	-7.5	-6.4
Piv-Ala-(S)-Aza-NHMe <b>(S)-42b<sup>b</sup></b>	-	7.48	-	8.72	-6.5	-6.2
Piv-Ala-(R)-Aza-NHMe <b>(R)-42b<sup>b</sup></b>	-	7.28	-	7.98	-7.1	<b>-3.6</b>

<sup>a</sup> Valores en ppb/K.  $\Delta\delta$  medido en DMSO- $d_6$ , 30-60 °C. <sup>b</sup> Los datos de RMN indicados como (S) o (R) pueden estar intercambiados.

En conjunto, los estudios conformacionales en disolución por RMN han mostrado que las 2-carboxiazetidinas en posición  $i+2$  de modelos tetrapeptídicos sencillos, favorecen la formación de un enlace de hidrógeno en el que se encuentra implicado el NH del residuo *C*-terminal. Es de destacar que la presencia de un sustituyente  $R^1$  en posición  $\alpha$  del anillo de 2-carboxiazetidina favorece la formación de estos enlaces, de manera análoga a lo que sucedía en los dipéptidos que contenían un anillo de azetidina en posición  $i+1$  de los modelos tetrapeptídicos. Por otro lado, y contrariamente a lo sucedido en derivados dipeptídicos con restricción conformacional en  $i+1$ , no existe ninguna correlación entre el tipo de sustituyente  $R^2$  en el extremo *N*-terminal y la formación o no de enlaces de hidrógeno intramoleculares.

Los estudios conformacionales de los modelos tetrapeptídicos  $R^2$ -CO-Ala-Xaa-NHMe por modelización molecular, FT-IR y RMN apoyan la existencia de conformaciones de giros inversos en aquellos que incorporan un residuo de 2-alkil-2-carboxiazetidina, aunque no permiten identificar si la conformación de estos péptidos se corresponde con un giro  $\beta$  o  $\gamma$ . Así, si el protón amida del resto NH-Me formara un enlace de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo del residuo de alanina la conformación sería de giro  $\gamma$ , mientras que si el oxígeno implicado fuera el del grupo acetilo, pivaloilo o benciloxycarbonilo, el giro inducido sería  $\beta$  (Figura 21). Los estudios de modelización molecular mostraron conformaciones de giro  $\gamma$  y  $\beta$  dentro de las de mínima energía, siendo mayor la población de confórmeros que presentaban giro  $\gamma$ . Sin embargo, y debido a la sobrestimación de los giros  $\gamma$  en los estudios de modelización molecular, sería arriesgado afirmar que ésta es la disposición tridimensional adoptada por nuestros péptidos. Por otra parte, los estudios de correlación espacial 2D de tipo NOESY tanto en  $CDCl_3$  como en  $DMSO-d_6$  no resultaron concluyentes, al no observarse nOes no secuenciales que permitieran apoyar uno u otro tipo de giro. Tan sólo se observó un nOe muy débil entre los grupos  $CH_3-NH$  y  $CH_3-CO$  para el derivado Ac-Ala-Azf-NHMe (**41c**), que podría indicar cierta población de giro  $\beta$  para este derivado en disolución. Era necesario, por tanto, intentar obtener estructuras cristalinas para algunos de estos derivados dipeptídicos  $R^2$ -CO-Ala-Azx-NHMe.

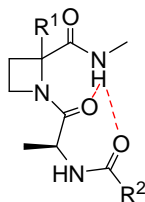


Figura 21

#### 1.5.2.4. Cristalografía de Rayos X.

Una búsqueda bibliográfica de péptidos pequeños lineales que poseyeran estructura de giro  $\gamma$  en estado cristalino reveló que existen escasos ejemplos de este tipo de conformación. Entre ellos se encuentran péptidos con un enlace peptídico reducido ( $\psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$ ). De hecho, el primer ejemplo de un péptido pequeño lineal con esta estructura lo constituye un análogo reducido del tripéptido *C*-terminal de oxitocina (Boc-Pro $\psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$ Leu-Gly-NH<sub>2</sub>, Figura 22, A)<sup>154,155</sup>.

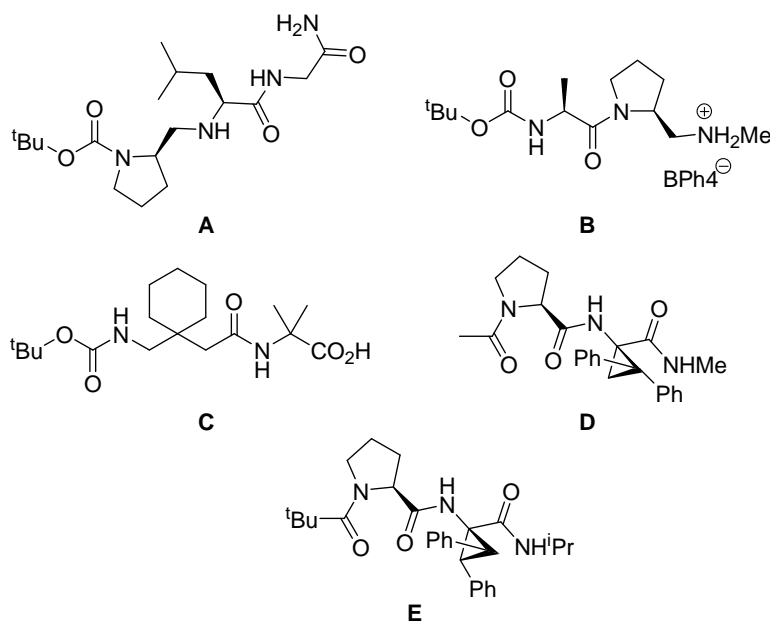
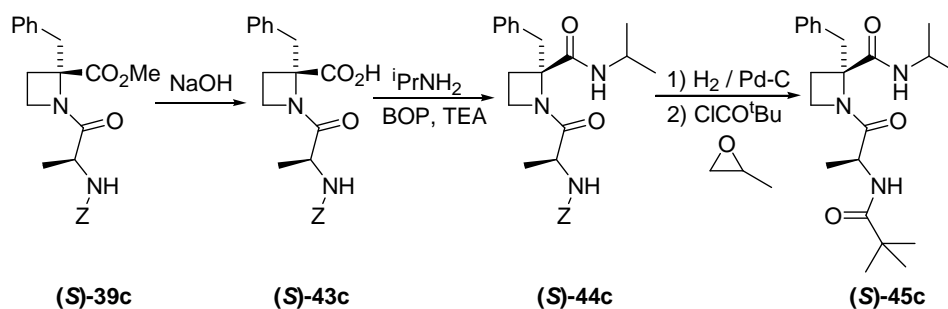


Figura 22. Péptidos lineales de pequeño tamaño que presentan estructura de giro  $\gamma$  o relacionadas en estado sólido.

Por otra parte, la incorporación de  $\alpha$ -hidrazino derivados en péptidos ha conducido a estructuras 3D que presentan anillos de ocho miembros con enlace de hidrógeno entre el  $\text{CO}^i$  y  $\text{NH}^{i+2}$ , y que se pueden considerar como una conformación de giro  $\gamma$  expandida (Figura 22, **B**)<sup>156</sup>. Análogamente, la incorporación del  $\gamma$  aminoácido  $\beta,\beta$ -disustituido Gabapentin, conduce a estructuras  $\text{C}_9$  que también se podrían considerar como una expansión de la  $\text{C}_7$  (giro  $\gamma$ ) presente en péptidos compuestos de  $\alpha$ -aminoácidos (Figura 22, **C**)<sup>157</sup>. Finalmente, existen una serie de dipéptidos que incorporan residuos conformacionalmente restringidos de Phe,  $\text{c}_3\text{Dip}$  (1-amino-2,2-difenilciclopropano, Figura 22, **D**)<sup>102</sup> o  $\text{c}_3\text{diPhe}$  (1-amino-2,3-difenilciclopropano, Figura 22, **E**)<sup>158</sup>, que adoptan conformaciones de giro  $\gamma$  en estado sólido.

Animados por los ejemplos bibliográficos de péptidos lineales de pequeño tamaño cristalizados, y con objeto de establecer el tipo de giro inducido por los derivados de azetidina en posición  $i+2$ , decidimos intentar la cristalización de algunos de estos dipéptidos para dilucidar su estructura 3D mediante técnicas de difracción de Rayos X. Así, en primer lugar se intentó la cristalización de los derivados de acetilo **41c** (Ac-Ala-Azf-NHMe) y pivaloilo **42c** (Piv-Ala-Azf-NHMe). Desafortunadamente, y aunque se ensayaron diferentes condiciones de cristalización, en ningún caso se consiguieron cristales adecuados para su resolución por difracción de Rayos X. Considerando los buenos resultados que en estudios de cristalización de péptidos pequeños se había conseguido con un grupo isopropilamina en posición C-terminal<sup>154,158,159</sup>, se procedió a la síntesis del derivado Piv-Ala-(S)-Azf-NH<sup>i</sup>Pr ((**S**)-**45c**, Esquema 18).



Esquema 18

En primer lugar, se saponificó el diastereoisómero mayoritario de Z-Ala-(S)-Azf-OMe [(S)-39c] con NaOH 2N, para dar lugar al ácido (S)-43c. Seguidamente se procedió al acoplamiento entre (S)-43c y <sup>i</sup>PrNH<sub>2</sub> utilizando BOP como agente de acoplamiento y TEA como base, lo que condujo a Z-Ala-(S)-Azf-NH<sup>i</sup>Pr [(S)-44c]. La presencia de dos nuevos grupos metilo en torno a 1.10 ppm en los espectros de <sup>1</sup>H RMN y un grupo CH muy desapantallado (3.80 ppm) confirmaron el acoplamiento. Por último, la hidrogenación del grupo benciloxicarbonilo utilizando Pd-C y posterior reacción de la amina resultante con cloruro de pivaloilo, y óxido de propileno como captador de hidrácido, condujo a (S)-45c. La conformación en disolución del único rotámero existente para los compuestos (S)-44c y (S)-45c se determinó como *trans* en base a la correlación entre el protón α del residuo de alanina y los protones H-4 del anillo de azetidina, encontrada en experimentos NOESY. Como se había observado para derivados análogos con un anillo de Azf en posición i+2, los estudios de temperatura realizados sobre estos derivados mostraron protección al disolvente del protón amídico C-terminal (Tabla 15).

Tabla 15. Desplazamientos químicos y coeficientes de temperatura de (S)-44c y (S)-45c.

Compuesto	δNH-Ala (ppm)		δNH- <sup>i</sup> Pr (ppm)		Δδ/ΔT <sup>a</sup> NH-Ala	Δδ/ΔT <sup>a</sup> NH-Me
	CDCl <sub>3</sub>	DMSO	CDCl <sub>3</sub>	DMSO		
Z-Ala-(S)-Azf-NH <sup>i</sup> Pr (S)-44c	5.45	7.67	8.07	7.99	-6.0	-1.8
Piv-Ala-(S)-Azf-NH <sup>i</sup> Pr (S)-45c	6.07	7.68	7.92	7.73	-5.8	-0.1

<sup>a</sup> Valores en ppb/K. Δδ medido en DMSO-d<sub>6</sub>, 30-60 °C.

Tras la purificación y aislamiento de (S)-45c se cristalizó de hexano, obteniendo cristales que pudieron ser resueltos por difracción de Rayos X. La estructura cristalina reveló la presencia de una molécula de (S)-45c en la unidad asimétrica, que forman dímeros estabilizados mediante un enlace de hidrógeno intermolecular entre el NH-Ala de un monómero, y el grupo carbonilo del residuo de Ala del otro monómero (Figura 23). El análisis de esta estructura molecular mostró la presencia de conformaciones *trans* en los dos enlaces amidas presentes en la molécula, confirmando los resultados de los estudios anteriores que indicaban la alta preferencia por la disposición *trans* del enlace amida precedente al residuo de Pro o Azx. Además, la distancia entre el nitrógeno del agrupamiento isopropilamino y el oxígeno del carbonilo del residuo de Ala (2.82 Å),

junto con el valor del ángulo N-H...O (156.6°), indicaron la existencia de un enlace de hidrógeno intramolecular característico de un giro  $\gamma$ . Los ángulos diedros del residuo de Azf  $\phi = -67.9^\circ$  y  $\psi = 51.4^\circ$  se encuentran dentro de los esperados para un giro  $\gamma$  inverso, y son muy similares a uno de los ejemplos encontrados en la bibliografía (MeCO-Pro-D-c<sub>3</sub>Dip-NHMe, Figura 22D,  $\phi = -72^\circ$  y  $\psi = 47^\circ$ )<sup>102</sup>. En conclusión, el dipéptido **(S)-45c** adopta una estructura de giro  $\gamma$  en estado sólido, confirmando los resultados obtenidos en los estudios de modelización molecular y clarificando los resultados de RMN. La representación de la estructura tridimensional de Rayos X se encuentra recogida en la Figura 23.

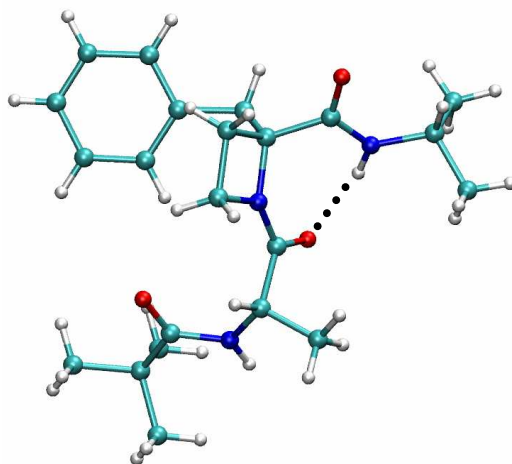


Figura 23. Estructura de Rayos X para el derivado **(S)-45c** [Piv-Ala-(S)-Azf-NH<sup>i</sup>Pr].

La comparación de la estructura 3D cristalina y los conformeros de mínima energía obtenidos en los estudios de modelización molecular del análogo tetrapeptídico Ac-Ala-(S)-Aza-NHMe (**41b**) muestran que la estructura tridimensional obtenida por difracción de Rayos X para el dipéptido Piv-Ala-(S)-Azf-NH<sup>i</sup>Pr [**(S)-45c**] es muy similar al mínimo global **41b-1**. Como se puede observar en la Figura 24, la mayor diferencia entre estas conformaciones se encuentra en el residuo de Ala. Los ángulos diedros para este residuo en la estructura cristalina del derivado **(S)-45c** son  $\phi = -84.0^\circ$  y  $\psi = 124.8^\circ$ , próximos a los valores calculados para la familia de conformeros de mínima energía **41b-1** ( $\phi = -68.8^\circ$  y  $\psi = 119.4^\circ$ ).

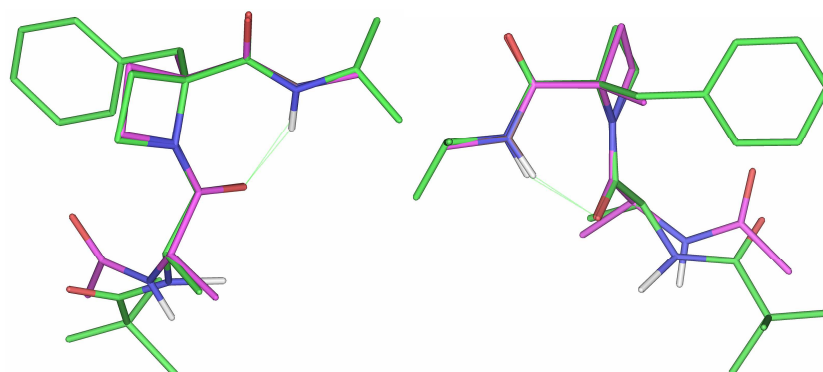


Figura 24. Superposición de la estructura cristalina de Rayos X de Piv-Ala-(*S*)-Azf-NH<sup>i</sup>Pr [(*S*)-**45c**, átomos de carbono en verde] y la conformación de mínima energía de Ac-Ala-(*S*)-Aza-NHMe (**41b-1**, morado), vistas desde dos ángulos distintos.

En resumen, los resultados de los análisis conformacionales (modelización molecular, FT-IR, RMN y Rayos X) de los péptidos que incorporan 2-alkil-2-carboxiazetidinas, tanto en posición *i*+1 como *i*+2, apoyan que estos aminoácidos restringidos facilitan la adopción de conformaciones de giro  $\gamma$ . Por lo tanto, estos derivados podrían aplicarse al estudio de la conformación bioactiva de péptidos, permitiendo realizar un “scan” de giros  $\gamma$ , mediante la sustitución sucesiva de los aminoácidos de los péptidos de interés por residuos de azetidina convenientemente funcionalizados. De igual manera, las 2-alkil-2-carboxiazetidinas serían esqueletos útiles para la obtención de análogos de péptidos de interés biológico en cuya conformación bioactiva estuvieran implicados giros  $\gamma$ .





## 1.6. Conclusiones.

Partiendo del interés de los giros inversos de la estructura secundaria peptídica en procesos de reconocimiento molecular, se ha explorado el espacio conformacional accesible a una serie de péptidos sencillos que incorporan en su estructura residuos de 2-alquil-2-carboxiazetidinas. Estos aminoácidos no naturales restringen el ángulo diedro  $\phi$  a valores próximos a los de los principales giros inversos. Adicionalmente, y a efectos comparativos, se han estudiado las estructuras inducidas por sus homólogos superiores Pro y  $\alpha$ -MePro. Los resultados obtenidos conducen a las siguientes conclusiones:

1. Los estudios de modelización molecular, RMN, IR y Rayos X de una serie de modelos tetrapeptídicos sencillos portadores de derivados de prolina o azetidina-2-carboxilato en posición  $i+1$  o  $i+2$ , han mostrado la capacidad de estos residuos para inducir giros inversos estabilizados por enlaces de hidrógeno intramoleculares.
2. Se ha observado, en todos los casos, una influencia positiva de la disustitución en el carbono  $\alpha$  del residuo de 2-carboxiazetidina o prolina sobre la capacidad para inducir giros inversos de estos aminoácidos.
3. Los estudios conformacionales han mostrado una clara influencia del tamaño del anillo de estos aminoácidos cíclicos  $\alpha C^i - \alpha N^i$  en el tipo de giro inverso inducido:
  - a. Los péptidos que incorporan derivados de prolina presentan, de acuerdo a lo previamente descrito en la bibliografía, tendencia a la formación de giros  $\beta$ , principalmente cuando se encuentran situados en posición  $i+1$  del giro (Figura 25).
  - b. Los péptidos que incorporan 2-alquil-2-carboxiazetidinas son capaces de inducir, tanto en posición  $i+1$  como  $i+2$ , giros  $\gamma$  en la cadena peptídica (Figura 25).

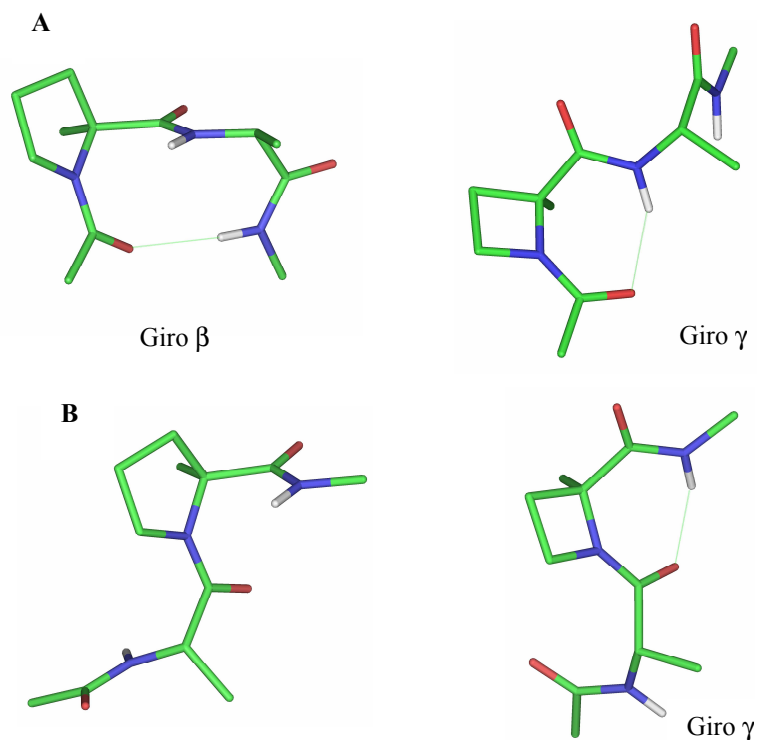


Figura 25. Representación de las estructuras de mínima energía de los dipéptidos que contienen  $\alpha$ -MePro y Aza en posiciones i+1 (A) e i+2 (B).

4. Los esqueletos de 2-alquil-2-carboxiazetidinas se pueden considerar inductores adecuados de giros  $\gamma$  ya que son capaces de reproducir la topografía de estos giros, a la vez que permiten la incorporación de la cadena lateral del aminoácido al que sustituyen. Además, poseen grupos NH y CO<sub>2</sub>H que las hacen adecuadas para su inserción en cadenas peptídicas. Por lo tanto, estos aminoácidos podrían considerarse complementarios a los derivados de prolina para la inducción de giros inversos.

## 1.7. Parte experimental.

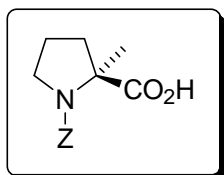
*Generalidades:* Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN se registraron en un espectrómetro Varian Gemini 200 (200 MHz), Varian INOVA-300 (300 MHz) o Bruker 300 (300 MHz), utilizando TMS como referencia interna. Los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN se registraron en un Varian INOVA-300 (75 MHz) o Bruker 300 (75 MHz). Los espectros de masas (Electrospray, modo positivo) se registraron en un espectrómetro Hewlett-Packard 1100SD. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en columna de gel de sílice Merck tipo 60 (230-400 mesh) o en capa fina utilizando cromatografía circular centrífuga (CCTLC) en un cromatotrón equipado con placas preparativas de 1 mm de espesor. Los HPLC analíticos se realizaron en un aparato Waters utilizando la columna de fase reversa Novapack  $\text{C}_{18}$  (3.9 x 150 mm, 4 $\mu\text{M}$ ), salvo que se indique lo contrario. La fase móvil empleada y referida como A:B corresponde a mezclas  $\text{CH}_3\text{CN}(\text{A})/\text{H}_2\text{O}(0.05\% \text{ TFA})(\text{B})$ . En todos los casos el flujo fue de 1 mL/min y la detección de picos se realizó por UV a 214 nm. Los espectros de infrarrojo se realizaron en un aparato Perkin-Elmer Spectrum One. Los poderes rotatorios se determinaron en un polarímetro Perkin Elmer 141. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Reichert-Jung Kofler y están sin corregir.

Los compuestos Z-Pro-OH (**1a**), Boc-Azf-OH (**2a**), Z-Pro-Ala-OMe (**20a**) y H-Pro-OMe (**33a**) se obtuvieron de fuentes comerciales.

Los compuestos Z-(*R,S*)-Azf-OH (**3c**), (*S*)-4-(+)-(10'-*N,N*-d ciclohexilsulfamoil)isobornoxicarbonilo-4-metil-1-(*p*-metoxi)bencil-2-azetidinona (**4b**), Pmb-Phe-OMe (**7c**), *N*-cloroacetil-*N*-(*p*-metoxi)bencil-Phe-OMe (**8c**), (*R,S*)-4-bencil-1-(*p*-metoxi)bencil-4-metoxicarbonil-2-azetidinona [(*R,S*)-**9c**], Pmb-(*R,S*)-Azf-OMe [(*R,S*)-**10c**], Z-(*R,S*)-Azf-OMe [(*R,S*)-**11c**], H-(*R,S*)-Azf-OMe [(*R,S*)-**12c**], Z-(*S*)-Azf-Ala-NHMe [(*S*)-**28c**], Z-(*R*)-Azf-Ala-NHMe [(*R*)-**28c**], Z-Ala-(*S*)-Azf-OMe [(*S*)-**39c**], Z-Ala-(*R*)-Azf-OMe [(*R*)-**39c**] y Z-Ala-(*S*)-Azf-NHMe [(*S*)-**40c**] ya se han descrito previamente<sup>103,105,106,160</sup>.

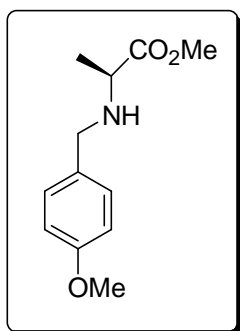
### 1.7.1. Preparación de aminoácidos y otros productos de partida.

#### Síntesis de Z- $\alpha$ -MePro-OH (1b).



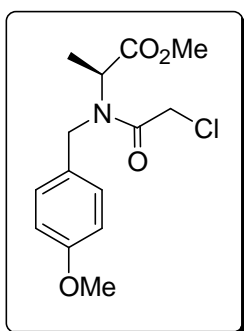
A una disolución  $\alpha$ -MePro-OH (150 mg, 1.16 mmol) en H<sub>2</sub>O (13 mL) a 0 °C se añade consecutivamente Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (283 mg, 2.67 mmol) y cloroformiato de bencilo (210  $\mu$ l, 1.51 mmol). Tras 9 días de reacción a 50 °C se añade una mezcla de hielo/agua y se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase acuosa se acidifica con HCl 1M hasta pH=2 y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora a sequedad, obteniéndose 220 mg del producto del epígrafe sin más purificación, (72 % de Rdto.) en forma de sirupe. HPLC:  $t_R$ = 4.08 min (A:B=30:70).  $[\alpha]_D^{25}$  = -27.18 (c=1.51, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Proporción de rotámeros 1.9:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  7.30 (m, 5H, Ph), 5.12 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 3.50 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.30 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.95-1.70 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>- $\alpha$ Pro), Rotámero minoritario:  $\delta$  7.30 (m, 5H, Ph), 5.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 3.70-3.51 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.25 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.95-1.70 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>- $\alpha$ Pro). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Rotámero mayoritario:  $\delta$  178.9 (CO- $\alpha$ Pro), 154.7 (CO-Z), 136.4 (C-Ph), 128.3, 127.7, 126.9 (CH-Ph), 66.9 (CH<sub>2</sub>-Z), 65.7 ( $\alpha$ -C, Pro), 47.9 ( $\delta$ -C, Pro), 39.1 ( $\beta$ -C, Pro), 23.1 ( $\gamma$ -C, Pro), 21.1 (CH<sub>3</sub>- $\alpha$ Pro), Rotámero minoritario:  $\delta$  180.0 (CO- $\alpha$ Pro), 154.3 (CO-Z), 136.2 (C-Ph), 128.3, 127.7, 126.9 (CH-Ph), 67.1 (CH<sub>2</sub>-Z), 64.8 ( $\alpha$ -C, Pro), 48.5 ( $\delta$ -C, Pro), 40.5 ( $\beta$ -C, Pro), 22.6 ( $\gamma$ -C, Pro), 22.8 (CH<sub>3</sub>- $\alpha$ Pro). EM (ES modo positivo): 264.0 [M+1]<sup>+</sup>, 286.0 [M+Na]<sup>+</sup>, 549.3 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>: C, 63.87; H, 6.51; N, 5.32. Anal. Exp. (%): C, 63.46; H, 6.80; N, 5.20.

### Síntesis de Pmb-Ala-OMe (**7b**).



Se disuelve H-Ala-OMe·HCl (7.5 g, 53.74 mmol) en MeOH (50 mL), se añade TEA (7.47 mL, 53.74 mmol) y *p*-anisaldehído (7.82 mL, 64.44 mmol) y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 1 h y 30 min. Transcurrido este tiempo se enfría la disolución a 0 °C y se añade NaBH<sub>4</sub> (4.06 g, 107.48 mmol) dejando reaccionar 30 min. Tras la evaporación del disolvente, se disuelve el crudo en AcOEt y se lava con H<sub>2</sub>O y disolución saturada NaCl, secando la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tras purificación por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente de 6 a 10 % de AcOEt en hexano, se consiguió aislar 10.09 g de **7b** en forma de aceite con un 84 % de Rdto. HPLC: *t<sub>R</sub>* = 2.60 min (A:B=40:60). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -8.07 (*c*=0.83, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.27 (d, 2H, *J*=8.3, 2-H y 6-H Pmb), 6.88 (d, 2H, *J*=8.3, 3-H y 5-H Pmb), 3.82 (s, 3H, *p*-OMe), 3.76 (d, 1H, *J*=12.6, N-CH<sub>2</sub>), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.63 (d, 1H, *J*=12.6, N-CH<sub>2</sub>), 3.41 (c, 1H, *J*=6.9,  $\alpha$ -H, Ala), 1.72 (s, 1H, NH), 1.34 (d, 3H, *J*=6.9,  $\beta$ -H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  176.1 (CO), 158.7 (4-C Pmb), 131.8 (1-C Pmb), 129.3 (2-C y 6-C Pmb), 113.7 (3-C y 5-C Pmb), 55.7 (*p*-OMe), 55.1 ( $\alpha$ -C, Ala), 51.6 (OMe), 51.3 (N-CH<sub>2</sub>), 19.0 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 224.0 [M+1]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>: C, 64.55; H, 7.67; N, 6.27. Anal. Exp. (%): C, 64.46; H, 7.81; N, 6.20.

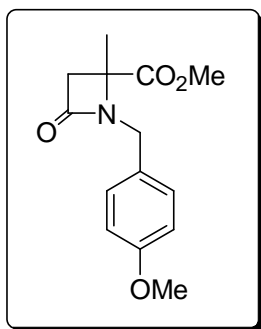
### Síntesis de *N*-cloroacetyl-*N*-(*p*-metoxi)bencil-Ala-OMe (**8b**).



Se disuelve Pmb-Ala-OMe (**7b**) (6.05 g, 27.11 mmol) en THF (30 mL) y se añade óxido de propileno (28.49 mL, 406.65 mmol). Se enfría la disolución a 0 °C y se añade cloruro de cloroacetyl (2.59 mL, 32.53 mmol). Tras 2 h de agitación se evapora el disolvente y se purifica el residuo resultante por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente de 14 a 20 % de AcOEt en hexano. De esta forma se obtienen 7.76 g del producto **8b** en forma de sirupe con un 96 % de Rdto. HPLC: *t<sub>R</sub>* = 3.36 min (A:B=35:65). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -49.43 (*c*=1.03,

CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.21 (d, 2H, *J*=8.5, 2-H y 6-H Pmb), 6.90 (d, 2H, *J*=8.5, 3-H y 5-H Pmb), 4.63 (d, 1H, *J*=16.7, N-CH<sub>2</sub>), 4.53 (m, 1H, α-H, Ala), 4.52 (d, 1H, *J*=16.7, N-CH<sub>2</sub>), 4.09 (d, 1H, *J*=12.7, CH<sub>2</sub>-Cl), 4.01 (d, 1H, *J*=12.7, CH<sub>2</sub>-Cl), 3.81 (s, 3H, *p*-OMe), 3.69 (s, 3H, OMe), 1.39 (d, 3H, *J*=7.2, β-H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171.4 (CO-O), 167.0 (CO-N), 159.3 (4-C Pmb), 128.9 (1-C Pmb), 127.8 (2-C y 6-C Pmb), 114.3 (3-C y 5-C Pmb), 55.2 (α-C, Ala), 54.7 (*p*-OMe), 52.2 (OMe), 50.3 (N-CH<sub>2</sub>), 41.6 (CH<sub>2</sub>-Cl), 14.4 (β-C, Ala). EM (ES modo positivo): 322.0 [M+Na]<sup>+</sup>, 621.3 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>4</sub>: C, 56.10; H, 6.05; Cl, 11.83; N, 4.67. Anal. Exp. (%): C, 55.87; H, 6.08; Cl, 11.67; N, 4.39.

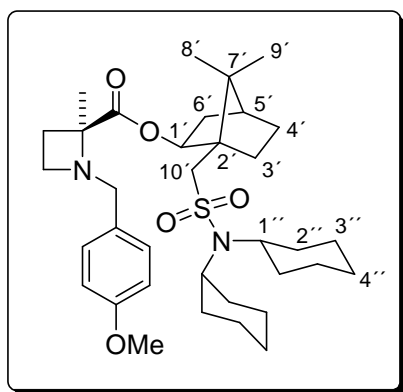
**Síntesis de (R,S)-4-metil-1-(*p*-metoxi)bencil-4-metoxycarbonil-2-azetidina [(R,S)-9b].**



A una disolución del compuesto **8b** (11.52 g, 38.52 mmol) en CH<sub>3</sub>CN seco (50 mL) se añade Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (25.10 g, 77.04 mmol) bajo atmósfera de argón. Tras 5 días se evapora el disolvente a sequedad, se disuelve el crudo en AcOEt:H<sub>2</sub>O (1:1) y se lava con HCl (0.1 N), H<sub>2</sub>O y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el crudo se purifica en columna de gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente de 17 a 33 % de AcOEt en hexano, obteniéndose 5.83 g del producto **(R,S)-9b** (57 %) en forma de sirupe. HPLC: *t<sub>R</sub>* = 3.12 min (A:B=30:70). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.20 (d, 2H, *J*=8.6, 2-H y 6-H Pmb), 6.84 (d, 2H, *J*=8.6, 3-H y 5-H Pmb), 4.46 (d, 1H, *J*=15.0, 1-CH<sub>2</sub>), 4.27 (d, 1H, *J*=15.0, 1-CH<sub>2</sub>), 3.79 (s, 3H, *p*-OMe), 3.60 (s, 3H, OMe), 3.25 (d, 1H, *J*=14.4, H-3), 2.81 (d, 1H, *J*=14.4, H-3), 1.37 (s, 3H, 4-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 172.4 (CO-O), 165.5 (2-CO), 159.1 (4-C Pmb), 130.0 (2-C y 6-C Pmb), 127.7 (1-C Pmb), 113.8 (3-C y 5-C Pmb), 58.7 (4-C), 55.1 (*p*-OMe), 52.3 (OMe), 48.9 (3-C), 44.1 (1-CH<sub>2</sub>), 20.6 (4-CH<sub>3</sub>). EM (ES modo positivo): 264.0 [M+1]<sup>+</sup>, 286.0 [M+Na]<sup>+</sup>, 549.3 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>: C, 63.87; H, 6.51; N, 5.32. Anal. Exp. (%): C, 63.79; H, 6.55; N, 5.26.

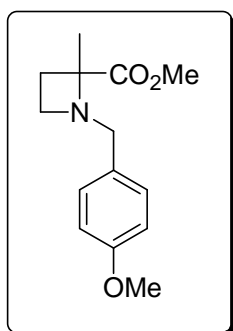
### Síntesis de 2-metil-2-carboxiazetidinas.

*Procedimiento general:* A una disolución en THF seco (23 mL) que contiene la correspondiente  $\beta$ -lactama convenientemente sustituida (18.15 mmol) junto a  $\text{RhH}(\text{CO})(\text{PPh}_3)_3$  (166 mg, 0.18 mmol) se añade, bajo atmósfera de argón,  $\text{Ph}_2\text{SiH}_2$  (8.37 mL, 45.37 mmol). Tras 24 h de reacción se evapora el disolvente a sequedad, se disuelve el crudo en  $\text{Et}_2\text{O}$  y se lava con  $\text{HCl}$  1M. Se lleva la fase acuosa a  $\text{pH}=11$  con  $\text{NaOH}$  2N y se extrae el producto con  $\text{AcOEt}$ . Tras evaporación del disolvente, se purifica el crudo de reacción en columna de gel de sílice con el sistema de eluyentes indicado en cada caso.



**(S)-2-(+)-(10'-N,N-Diciclohexilsulfamoil)-isobornil-1-(p-metoxi)bencil-2-metilazetidina-2-carboxilato (5b):** Sirupe. Rdto. 42 % [A partir de (S)-4-(+)-(10'-N,N-diciclohexilsulfamoil) isobornoxicarbonilo-4-metil-1-(p-metoxi)bencil-2-azetidinona (4b)]. Gradiente de 9 a 14 % de  $\text{AcOEt}$  en hexano. HPLC:  $t_R = 4.77$  min (A:B=30:70).  $[\alpha]_D = +5.73$  ( $c=1.09$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.20 (d, 2H,  $J=8.5$ , 2-H y 6-H Pmb), 6.79 (d, 2H,  $J=8.5$ , 3-H y 5-H Pmb), 4.91 (dd, 1H,  $J=7.8$ , 2.7, H-1'), 3.76 (s, 3H, p-OMe), 3.74 (d, 1H,  $J=12.9$ , 1- $\text{CH}_2$ ), 3.55 (d, 1H,  $J=12.9$ , 1- $\text{CH}_2$ ), 3.25 (m, 3H, H-4, H-1''), 3.16 (d, 1H,  $J=13.4$ , H-10'), 3.00 (m, 1H, H-4), 2.59 (d, 1H,  $J=13.4$ , H-10'), 2.56 (m, 1H, H-3), 2.00 (m, 1H, H-3), 1.81 (m, 2H, H-3', H-6'), 1.73 (m, 17H, H-2'', H-3', H-3'', H-4', H-5', H-6'), 1.56 (m, 2H, H-4''), 1.45 (s, 3H, 4- $\text{CH}_3$ ), 1.24 (m, 5H, H-3'', H-4'), 0.98 (m, 2H, H-4'), 0.93 y 0.83 (s, 6H, H-8' y H-9').  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.2 (2-CO), 158.2 (4-C Pmb), 134.6 (1-C Pmb), 129.8 (2-C y 6-C Pmb), 113.6 (3-C y 5-C Pmb), 78.7 (1'-C), 67.5 (2-C), 57.4 (1''-C), 55.2 (OMe), 54.6 (1- $\text{CH}_2$ ), 54.0 (10'-C), 49.5 y 49.2 (2'-C y 7'-C), 48.8 (4-C), 44.4 (5'-C), 39.9 (6'-C), 33.3 y 32.3 (2''-C), 30.6 (3'-C), 28.9 (3-C), 27.1 (4'-C), 26.4 (3''-C), 25.2 (4''-C), 20.4 (2- $\text{CH}_3$ ), 20.2 y 19.6 (8'-C y 9'-C). EM (ES modo positivo): 615.3  $[\text{M}+1]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ : C, 68.37; H, 8.85; N, 4.56; S, 5.21. Anal. Exp. (%): C, 68.71; H, 8.53; N, 4.31; S, 5.02.

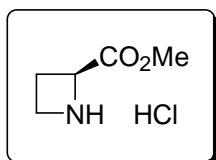


**Pmb-(*R,S*)-Aza-OMe [(*R,S*)-10b]:** Aceite. Rdto. 63 % [A partir de (*R,S*)-9b]. Gradiente de 14 a 20 % de AcOEt en hexano. HPLC:  $t_R$  = 3.25 min (A:B=20:80).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.21 (d, 2H,  $J$ =8.7, 2-H y 6-H Pmb), 6.83 (d, 2H,  $J$ =8.7, 3-H y 5-H Pmb), 3.78 (s, 3H, *p*-OMe), 3.73 (s, 3H, OMe), 3.68 (d, 1H,  $J$ =12.5, 1-CH<sub>2</sub>), 3.50 (d, 1H,  $J$ =12.5, 1-CH<sub>2</sub>), 3.21 (ddd, 1H,  $J$ =8.3, 6.5, 4.5, H-4), 3.06 (dt, 1H,  $J$ =8.3, 6.8, H-4), 2.55 (m, 1H, H-3), 1.91 (m, 1H, H-3), 1.47 (s, 3H, 4-CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  175.1 (CO), 158.5 (4-C Pmb), 130.1 (1-C Pmb), 129.8 (2-C y 6-C Pmb), 113.6 (3-C y 5-C Pmb), 67.5 (2-C), 55.1 (*p*-OMe), 55.0 (1-CH<sub>2</sub>), 51.6 (OMe), 48.9 (4-C), 28.5 (3-C), 18.7 (4-CH<sub>3</sub>). EM (ES modo positivo): 250.1 [ $\text{M}+1$ ]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ : C, 67.45; H, 7.68; N, 5.62. Anal. Exp. (%): C, 67.30; H, 7.53; N, 5.37.

#### Síntesis de derivados de H-Xaa-OMe.

**Método A:** A una disolución del correspondiente aminoácido (2.98 mmol) en MeOH (20 mL) a 0 °C se añade  $\text{SOCl}_2$  (0.65 mL, 8.95 mmol), dejando reaccionar a temperatura ambiente durante 1-7 días. La evaporación del disolvente condujo al compuesto buscado sin más purificación.

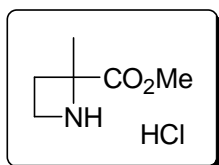
**Método B:** A una disolución de Pmb-(*R,S*)-Aza-OMe (**(*R,S*)-10b**) (2 g, 8.03 mmol) en MeOH (50 mL) a 0 °C se añade  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  (600 mg, 30% en peso) y HCl (0.69 mL, 8.03 mmol). La suspensión se hidrogena a 45 psi y 50 °C durante 12 h. Una vez separado el catalizador por filtración se evapora el disolvente a sequedad, dando lugar a H-(*R,S*)-Aza-OMe·HCl [**(*R,S*)-12b**], que se utiliza en etapas siguientes sin más purificación.



**H-Azg-OMe·HCl (12a):** Aceite. Rdto. 99 %. (A partir de Boc-Azg-OH, *Método A*, 1 día).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.12 (m, 1H, H-2), 4.13 (m, 2H, H-4), 3.80 (s, 3H, OMe), 2.75-2.62 (m, 3H, H-3, NH). EM (ES modo positivo): 116.0

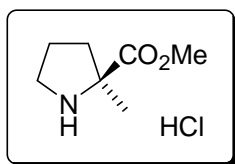


$[M+1]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $C_5H_{10}ClNO_2$ : C, 39.62; H, 6.65; Cl, 23.39; N, 9.24. Anal. Exp. (%): C, 39.79; H, 6.60; Cl, 23.23; N, 9.30.



**H-(*R,S*)-Aza-OMe-HCl [(*R,S*)-12b]:** Aceite. Rdto. 90 % [A partir de (*R,S*)-10b, Método B].  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  6.05 (s a, 1H, NH), 3.94 (t, 2H,  $J=8.3$ , H-4), 3.82 (s, 3H, OMe), 2.70 (m, 1H, H-3), 2.44 (m, 1H, H-3), 1.84 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>, Aza).

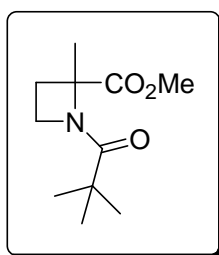
EM (ES modo positivo): 130.1  $[M+1]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $C_6H_{12}ClNO_2$ : C, 43.51; H, 7.30; Cl, 21.41; N, 8.46. Anal. Exp. (%): C, 43.75; H, 7.12; Cl, 21.38; N, 8.60.



**H- $\alpha$ -MePro-OMe-HCl (33b):** Sólido blanco. P.f. 133-135 °C. Rdto. 85% (A partir de H-MePro-OH, Método A, 7 días).  $[\alpha]_D^{25} = -58.8$  (c=1,  $CHCl_3$ ).  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  3.85 (s, 3H, OMe), 3.58 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.39 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro),

2.22-1.89 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.85 (s, 3H,  $\alpha$ -CH<sub>3</sub>, Pro).  $^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  170.9 (CO-Pro), 68.6 ( $\alpha$ -C, Pro), 53.5 (OMe), 45.0 ( $\delta$ -C, Pro), 35.7 ( $\beta$ -C, Pro), 22.4 ( $\gamma$ -C, Pro), 21.1 ( $\alpha$ -CH<sub>3</sub>, Pro). EM (ES modo positivo): 144.1  $[M+1]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $C_7H_{14}ClNO_2$ : C, 46.80; H, 7.86; Cl, 19.74 N, 7.80. Anal. Exp. (%): C, 46.75; H, 7.77; Cl, 19.98; N, 7.68.

#### Síntesis de Piv-(*R,S*)-Aza-OMe [(*R,S*)-13b].



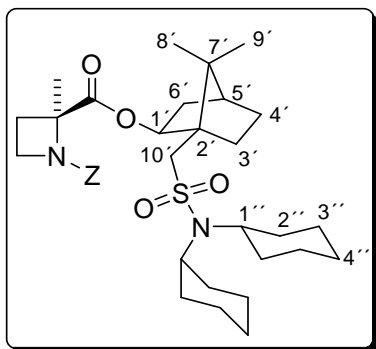
A una disolución de (*R,S*)-12b (92 mg, 0.71 mmol) en  $CH_2Cl_2$  seco (4 mL) a 0 °C bajo atmósfera de argón, se adiciona TEA (0.33 mL, 2.20 mmol) y cloruro de pivaloilo (0.14 mL, 1.14 mmol). Tras 2 h de reacción a temperatura ambiente se lava la reacción sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10 %,  $NaHCO_3$  al 10 %,  $H_2O$  y disolución saturada de NaCl. La fase

orgánica se seca sobre  $Na_2SO_4$  y se evapora el disolvente a sequedad, purificando el residuo en columna de gel de sílice con la mezcla de eluyentes MeOH: $CH_2Cl_2$  (1:100) para obtener (*R,S*)-13b (147 mg) en forma de sirupe con un 95 % de Rdto.  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  4.50-4.25 (m, 2H, H-4), 3.74 (s, 3H, OMe), 2.35 (ddd, 1H,  $J=11.1$ , 9.2,

5.3, H-3), 2.11 (ddd, 1H,  $J=11.1$ , 9.2, 7.0, H-3), 1.68 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.18 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  177.7 (CO-<sup>t</sup>Bu), 173.2 (2-CO), 68.0 (2-C), 52.3 (OMe), 50.1 (4-C), 38.3 (C-<sup>t</sup>Bu), 28.3 (3-C), 26.6 (CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu), 22.2 (2-CH<sub>3</sub>). EM (ES modo positivo): 214.1 [M+1]<sup>+</sup>, 449.2 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>: C, 61.95; H, 8.98; N, 6.57. Anal. Exp. (%): C, 61.89; H, 9.04; N, 6.66.

### N-Benciloxicarbonilación de derivados de 2-alkilazetidinas-2-carboxilato.

*Procedimiento general:* A una disolución del correspondiente derivado de azetidina protegida con un grupo *p*-(metoxi)bencilo (1.58 mmol) en MeOH (30 mL) a 0 °C, se añade HCl concentrado (0.14 mL, 1.58 mmol) y Pd(OH)<sub>2</sub> (30 % en peso) en el citado orden y se hidrogena a 45 psi y 50 °C de temperatura durante 12 h. Tras filtración del catalizador, se evapora el disolvente a sequedad, se disuelve el crudo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (4 mL) y se enfría a 0 °C, con posterior adición de óxido de propileno (1.66 mL, 23.70 mmol) y cloroformiato de bencilo (0.36 mL, 2.53 mmol). Tras 2 h de reacción a temperatura ambiente se lava la reacción sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10 %, NaHCO<sub>3</sub> al 10 %, H<sub>2</sub>O y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a sequedad, purificando el residuo en columna de gel de sílice en el sistema de eluyentes indicado en cada caso.

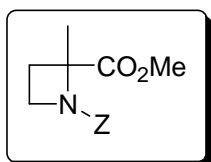


**(S)-1-Benciloxicarbonil-2-(+)-(10'-N-N-diciclohexilsulfamoil)-isobornil-2-metilazetidina-2-carboxilato (6b):** Sirupe. Rdto. 49 % (A partir de **5b**). Gradiente de 5 a 11 % de AcOEt en hexano.

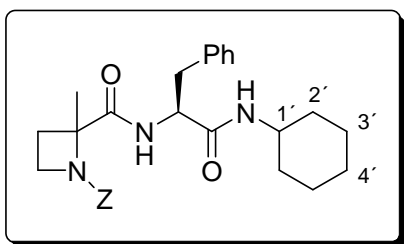
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Proporción de rotámeros 1:1. Rotámero A:  $\delta$  7.30 (m, 5H, Ph), 5.06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.96 (m, 1H, H-1'), 4.11 (m, 1H, H-4), 3.86 (m, 1H, H-4), 3.31 (d, 1H,  $J=13.4$ ,

H-10'), 3.22 (m, 2H, H-1''), 3.09 (d, 1H,  $J=13.4$ , H-10'), 2.57 (m, 2H, H-3), 2.05 (m, 2H, H-3', H-6'), 1.70 (m, 18H, H-2'', H-3'', H-3'', H-4', H-4'', H-5', H-6'), 1.60 (s, 3H, 4-CH<sub>3</sub>), 1.26 (m, 7H, H-3'', H-4', H-4''), 0.98 y 0.82 (s, 6H, H-8' y H-9'), Rotámero B:  $\delta$  7.30 (m, 5H, Ph), 5.06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.96 (m, 1H, H-1'), 4.11 (m, 1H, H-4), 3.86 (m, 1H, H-4), 3.31 (d, 1H,  $J=13.4$ , H-10'), 3.22 (m, 2H, H-1''), 3.09 (d, 1H,  $J=13.4$ , H-10'), 2.57 (m, 2H, H-3), 2.05 (m, 2H, H-3', H-6'), 1.70 (m, 18H, H-2'', H-3'', H-3'', H-4', H-4'', H-5', H-6'), 1.60 (s, 3H, 4-CH<sub>3</sub>), 1.26 (m, 7H, H-3'', H-4', H-4''), 0.98 y 0.82 (s, 6H, H-8' y H-9').

H-5', H-6'), 1.60 (s, 3H, 4-CH<sub>3</sub>), 1.26 (m, 7H, H-3'', H-4', H-4''), 0.87 y 0.78 (s, 6H, H-8' y H-9'). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Rotámero A: δ 170.9 (2-CO), 156.4 (CO-Z), 136.6 (C-Ph), 128.3, 127.9, 127.6 (CH-Ph), 79.7 (1'-C), 68.3 (2-C), 66.7 (CH<sub>2</sub>-Z), 57.4 (1''-C), 53.9 (10'-C), 49.3 y 49.0 (2'-C y 7'-C), 45.1 (4-C), 44.3 (5'-C), 39.4 (6'-C), 32.9 y 32.6 (2''-C), 30.5 (3'-C), 28.9 (3-C), 26.9 (4'-C), 26.4 (3''-C), 25.1 (4''-C), 22.8 (2-CH<sub>3</sub>), 20.3 y 19.8 (8'-C y 9'-C), Rotámero B: δ 171.4 (2-CO), 156.4 (CO-Z), 136.4 (C-Ph), 128.3, 127.8, 127.6 (CH-Ph), 79.7 (1'-C), 68.1 (2-C), 66.2 (CH<sub>2</sub>-Z), 57.3 (1''-C), 53.9 (10'-C), 49.5 y 49.2 (2'-C y 7'-C), 46.0 (4-C), 44.3 (5'-C), 39.7 (6'-C), 33.1 y 32.4 (2''-C), 30.5 (3'-C), 29.0 (3-C), 27.1 (4'-C), 26.4 (3''-C), 25.1 (4''-C), 22.3 (2-CH<sub>3</sub>), 20.4 y 19.9 (8'-C y 9'-C). EM (ES modo positivo): 629.3 [M+1]<sup>+</sup>, 651.3 [M+Na]<sup>+</sup>, 1279.7 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>35</sub>H<sub>52</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S: C, 66.85; H, 8.33; N, 4.45; S, 5.10. Anal. Exp. (%): C, 66.71; H, 8.51; N, 4.60; S, 5.00.



**Z-(*R,S*)-Aza-OMe [(*R,S*)-11b]:** Aceite. Rdto. 79 % [A partir de (*R,S*)-10b]. Gradiente de 11 a 20 % de AcOEt en hexano. HPLC:  $t_R$  = 6.59 min (A:B=30:70). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Proporción de rotámeros 1.7:1. Rotámero mayoritario: δ 7.28 (m, 5H, Ph), 5.05 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 3.98 (m, 1H, H-4), 3.82 (m, 1H, H-4), 3.51 (s, 3H, OMe), 2.29 (m, 1H, H-3), 2.12 (m, 1H, H-3), 1.60 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), Rotámero minoritario: δ 7.28 (m, 5H, Ph), 5.05 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 3.98 (m, 1H, H-4), 3.82 (m, 1H, H-4), 3.69 (s, 3H, OMe), 2.29 (m, 1H, H-3), 2.12 (m, 1H, H-3), 1.64 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Rotámero mayoritario: δ 173.0 (2-CO), 155.7 (CO-Z), 136.5 (C-Ph), 128.4, 127.9, 127.8 (CH-Ph), 68.1 (2-C), 66.5 (CH<sub>2</sub>-Z), 52.3 (OMe), 44.8 (4-C), 28.6 (3-C), 22.9 (2-CH<sub>3</sub>), Rotámero minoritario: δ 173.0 (2-CO), 155.7 (CO-Z), 136.5 (C-Ph), 129.8, 128.4, 126.9 (CH-Ph), 67.8 (2-C), 66.5 (CH<sub>2</sub>-Z), 52.3 (OMe), 45.9 (4-C), 28.8 (3-C), 22.3 (2-CH<sub>3</sub>). EM (ES modo positivo): 264.0 [M+1]<sup>+</sup>, 286.0 [M+Na]<sup>+</sup>, 549.3 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>: C, 63.87; H, 6.51; N, 5.32. Anal. Exp. (%): C, 63.69; H, 6.40; N, 5.59.

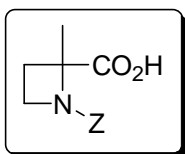


**Z-(*R,S*)-Aza-Phe-NHChx [(*R,S*)-17b]:** Sirupe. Rdto. 67 % [A partir de (*R,S*)-16b]. Gradiente de 17 a 50 % de AcOEt en hexano. HPLC:  $t_R$ = 10.38 min y 11.52 min (A:B=40:60).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Proporción de Diastereoisómeros 1.3:1. Diastereoisómero

mayoritario:  $\delta$  7.55 (m, 1H, NH-Phe), 7.28-7.08 (m, 10H, Ph), 5.97 (m, 1H, NH-Chx), 5.01 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Z}$ ), 4.47 (m, 1H,  $\alpha\text{-H}$ , Phe), 3.81 (m, 1H, H-4), 3.70 (m, 1H, 1'H), 3.60 (m, 1H, H-4), 3.09 (m, 1H,  $\beta\text{-H}$ , Phe), 2.96 (m, 1H,  $\beta\text{-H}$ , Phe), 2.38 (m, 1H, H-3), 1.99 (m, 1H, H-3), 1.72-1.43 (m, 4H, 2'-H, 4'-H), 1.65 (s, 3H, 2- $\text{CH}_3$ ), 1.29 (m, 2H, 3'-H), 1.20-0.85 (m, 4H, 2'-H, 3'-H), Diastereoisómero minoritario:  $\delta$  7.84 (m, 1H, NH-Phe), 7.28-7.08 (m, 10H, Ph), 5.71 (m, 1H, NH-Chx), 5.06 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Z}$ ), 4.47 (m, 1H,  $\alpha\text{-H}$ , Phe), 3.81 (m, 1H, H-4), 3.70 (m, 1H, 1'H), 3.60 (m, 1H, H-4), 3.09 (m, 1H,  $\beta\text{-H}$ , Phe), 2.96 (m, 1H,  $\beta\text{-H}$ , Phe), 2.58 (m, 1H, H-3), 1.99 (m, 1H, H-3), 1.72-1.43 (m, 4H, 2'-H, 4'-H), 1.68 (s, 3H, 2- $\text{CH}_3$ ), 1.29 (m, 2H, 3'-H), 1.20-0.85 (m, 4H, 2'-H, 3'-H). EM (ES modo positivo): 478.5  $[\text{M}+1]^+$ , 500.5  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 977.8  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_4$ : C, 70.42; H, 7.39; N, 8.80. Anal. Exp. (%): C, 70.37; H, 7.48; N, 8.70.

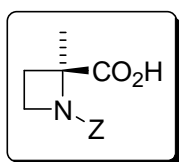
#### Saponificación de 2-metil-2-metoxycarbonilazetidinas.

*Procedimiento general:* Se disuelve el correspondiente éster metílico (1.39 mmol) en MeOH (5 mL) y se añade NaOH 2N (1.40 mL, 2.78 mmol) dejando reaccionar 24 h a temperatura ambiente. Tras evaporar el disolvente, el crudo se disuelve en agua y se lava con AcOEt. Seguidamente se lleva la fase acuosa a pH=2 mediante adición de HCl 1M, se extrae con AcOEt y se evapora a sequedad. El sólido resultante se liofiliza para obtener los productos, que se emplean sin más purificación en el paso siguiente de reacción.

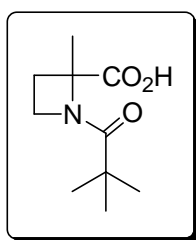


**Z-(*R,S*)-Aza-OH [(*R,S*)-3b]:** Sirupe. Rdto. 92 % [A partir de (*R,S*)-11b]. HPLC:  $t_R$ = 3.42 min (A:B=30:70).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Proporción de rotámeros 4:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  8.65 (m, 1H, COOH), 7.30 (m, 5H, Ph), 5.16 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Z}$ ), 3.91 (m, 2H, H-4), 2.76 (m, 1H, H-3), 2.14 (m, 1H, H-3), 1.74 (s, 3H, 2- $\text{CH}_3$ ), Rotámero minoritario: 8.65 (m, 1H, COOH), 7.30 (m, 5H, Ph), 5.16 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Z}$ ), 3.91 (m, 2H,

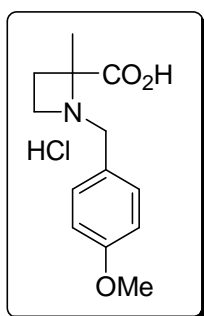
H-4), 2.44 (m, 1H, H-3), 2.14 (m, 1H, H-3), 1.67 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Rotámetro mayoritario: δ 174.6 (2-CO), 157.1 (CO-Z), 135.5 (C-Ph), 128.6, 128.2, 127.7 (CH-Ph), 69.1 (2-C), 67.7 (CH<sub>2</sub>-Z), 44.7 (4-C), 28.0 (3-C), 22.3 (2-CH<sub>3</sub>), Rotámetro minoritario: δ 174.6 (2-CO), 157.1 (CO-Z), 135.5 (C-Ph), 128.6, 128.2, 127.7 (CH-Ph), 69.1 (2-C), 66.8 (CH<sub>2</sub>-Z), 44.7 (4-C), 28.8 (3-C), 22.3 (2-CH<sub>3</sub>). EM (ES modo positivo): 250.1 [M+1]<sup>+</sup>, 272.0 [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>: C, 62.64; H, 6.07; N, 5.62. Anal. Exp. (%): C, 62.79; H, 6.00; N, 5.77.



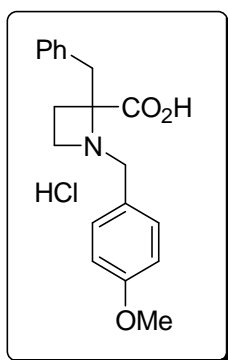
**Z-(S)-Aza-OH [(S)-3b]:** Sirupe. Rdto. 83 % (A partir de **6b**). Los datos espectroscópicos son idénticos a **(R,S)-3b**.



**Piv-(R,S)-Aza-OH [(R,S)-14b]:** Sirupe. Rdto. 75 % [A partir de **(R,S)-13b**]. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 13.38 (s a, 1H, COOH), 4.23 (m, 1H, H-4), 4.11 (ddd, 1H, *J*=9.9, 9.0, 5.4, H-4), 2.81 (ddd, 1H, *J*=12.1, 9.9, 7.3, H-3), 2.01 (ddd, 1H, *J*=12.1, 9.1, 5.4, H-3), 1.66 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.10 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu). EM (ES modo positivo): 200.1 [M+1]<sup>+</sup>, 222.0 [M+Na]<sup>+</sup>, 421.2 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>: C, 60.28; H, 8.60; N, 7.03. Anal. Exp. (%): C, 60.29; H, 8.53; N, 7.07.



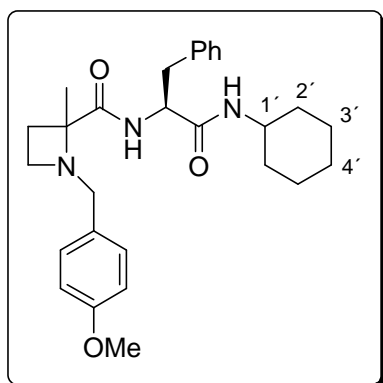
**Pmb-(R,S)-Aza-OH [(R,S)-15b]:** Sólido. P. f. 127-129 °C. Rdto. 99 % [A partir de **(R,S)-10b**]. HPLC: *t*<sub>R</sub> = 1.85 min (A:B=30:70). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 11.10 (s a, 1H, COOH), 7.48 (d, 2H, *J*=7.6, 2-H y 6-H Pmb), 6.97 (d, 2H, *J*=7.6, 3-H y 5-H Pmb), 4.25-4.00 (m, 2H, H-4), 3.77 (s, 3H, *p*-OMe), 3.66-3.10 (m, 2H, 1-CH<sub>2</sub>), 2.62 (m, 1H, H-3), 2.16 (m, 1H, H-3), 1.85 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>). EM (ES modo positivo): 236.2 [M+1]<sup>+</sup>, 258.2 [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>3</sub>: C, 57.46; H, 6.68; Cl, 13.05; N, 5.15. Anal. Exp. (%): C, 57.24; H, 6.90; Cl, 12.88; N, 5.33.



**Pmb-(*R,S*)-Azf-OH [(*R,S*)-15c]:** Sólido. P. f. 110-112 °C. Rdto. 99 % [A partir de (*R,S*)-10c]. HPLC:  $t_R$  = 5.47 min (A:B=20:80).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.52-6.74 (m, 9H, Ph, Pmb), 4.13-3.38 (m, 6H, H-4, 1- $\text{CH}_2$ , 2- $\text{CH}_2$ ), 3.70 (s, 3H, *p*-OMe), 2.72 (m, 2H, H-3). EM (ES modo positivo): 312.3 [ $\text{M}+1$ ] $^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{ClNO}_3$ : C, 65.61; H, 6.38; Cl, 10.19; N, 4.03. Anal. Exp. (%): C, 65.60; H, 6.56; Cl, 10.00; N, 4.22.

### 1.7.2. Síntesis de derivados Pmb-Azx-Phe-NHChx.

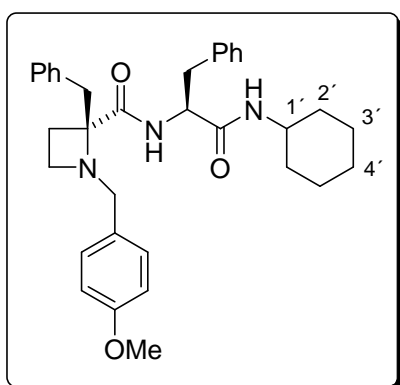
*Procedimiento general:* A una disolución de correspondiente aminoácido Pmb-Azx-OH (0.80 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (8 mL) se le adiciona H-Phe-NHChx (197 mg, 0.80 mmol), BOP (460 mg, 1.04 mmol) y TEA (0.26 mL, 1.84 mmol). Al cabo de 24 h de agitación a temperatura ambiente la disolución se lava con ácido cítrico al 10 %,  $\text{NaHCO}_3$  al 10 %,  $\text{H}_2\text{O}$  y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evapora el disolvente a sequedad, purificando el residuo en columna de gel de sílice empleando el sistema de eluyentes indicado en cada caso.



**Pmb-(*R,S*)-Aza-Phe-NHChx [(*R,S*)-16b]:** Sirupe. Rdto. 70 % [A partir de (*R,S*)-15b]. Gradiente de 20 a 50 % de AcOEt en hexano. HPLC:  $t_R$  = 4.37 min (A:B=40:60).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Proporción de diastereoisómeros 1.1:1. Diastereoisómero mayoritario:  $\delta$  8.40 (d, 1H,  $J$ =8.3, NH-Phe), 7.32-7.10 (m, 7H, Ph, 2-H y 6-H Pmb), 6.86 (d, 2H,  $J$ =8.8, 3-H y 5-H Pmb), 5.70 (d, 1H,  $J$ =8.0, NH-Chx), 4.47 (c, 1H,  $J$ =8.3,  $\alpha$ -H,

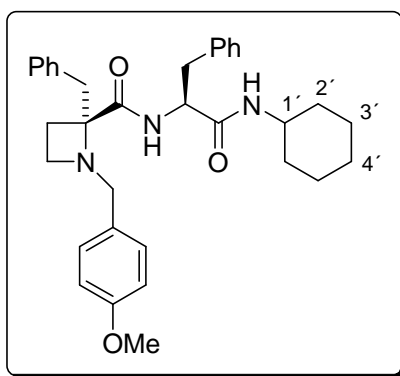
Phe), 3.79 (s, 3H, *p*-OMe), 3.53 (d, 1H,  $J$ =12.7, 1- $\text{CH}_2$ ), 3.35 (d, 1H,  $J$ =12.7, 1- $\text{CH}_2$ ), 3.23-2.87 (m, 5H, H-4,  $\text{CH}_2$ -Ph, 1'-H), 2.16 (m, 1H, H-3), 1.93 (m, 1H, H-3), 1.88-1.65 (m, 4H, 2'-H), 1.55 (m, 1H, 4'-H), 1.51 (s, 3H, 2- $\text{CH}_3$ ), 1.29 (m, 1H, 4'-H), 1.09 (m, 2H, 3'-H), 0.91 (m, 2H, 3'-H). Diastereoisómero minoritario:  $\delta$  8.30 (d, 1H,  $J$ =8.3, NH-Phe), 7.32-7.10 (m, 7H, Ph, 2-H y 6-H Pmb), 6.83 (d, 2H,  $J$ =8.8, 3-H y 5-H Pmb), 5.97 (d, 1H,  $J$ =8.0, NH-Chx), 4.47 (c, 1H,  $J$ =8.3,  $\alpha$ -H, Phe), 3.79 (s, 3H, *p*-OMe), 3.36 (d, 1H,  $J$ =12.0,

1-CH<sub>2</sub>), 3.31 (d, 1H,  $J=12.0$ , 1-CH<sub>2</sub>), 3.23-2.87 (m, 5H, H-4, 1'-H,  $\beta$ -H, Phe), 2.16 (m, 1H, H-3), 1.93 (m, 1H, H-3), 1.88-1.65 (m, 4H, 2'-H), 1.55 (m, 1H, 4'-H), 1.48 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.29 (m, 1H, 4'-H), 1.09 (m, 2H, 3'-H), 0.91 (m, 2H, 3'-H). EM (ES modo positivo): 464.5  $[M+1]^+$ . Anal. (%) Calc. para C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 72.54; H, 8.04; N, 9.06. Anal. Exp. (%): C, 72.31; H, 7.91; N, 9.00.



**Pmb-(R)-Azf-Phe-NHChx [(R)-16c]:** Sirupe. Rdto. 25 % [A partir de (**R,S**)-15c]. Eluyente: Et<sub>2</sub>O. HPLC:  $t_R$  = 10.19 min (A:B=40:60). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.20 (d, 1H,  $J=8.4$ , NH-Phe), 7.26-7.02 (m, 10H, Ph), 6.91 (d, 2H,  $J=8.5$ , 2-H y 6-H Pmb), 6.72 (d, 2H,  $J=8.5$ , 3-H y 5-H Pmb), 6.00 (d, 1H,  $J=8.1$ , NH-Chx), 4.54 (c, 1H,  $J=8.4$ ,  $\alpha$ -H, Phe), 3.71 (s, 3H, *p*-OMe), 3.67 (m, 1H, 1'-H), 3.48 (d, 1H,  $J=15.1$ ,

1-CH<sub>2</sub>), 3.35 (d, 1H,  $J=12.6$ , 2-CH<sub>2</sub>), 3.26 (d, 1H,  $J=15.1$ , 1-CH<sub>2</sub>), 3.25 (d, 1H,  $J=12.6$ , 2-CH<sub>2</sub>), 3.06 (m, 1H, H-4), 2.99 (m, 2H,  $\beta$ -H, Phe), 2.93 (m, 1H, H-4), 2.15 (m, 1H, H-3), 2.03 (m, 1H, H-3), 1.73 (m, 2H, 2'-H), 1.54 (m, 2H, 4'-H), 1.24 (m, 2H, 3'-H), 1.02 (m, 2H, 3'-H), 0.86 (m, 2H, 2'-H). EM (ES modo positivo): 540.5  $[M+1]^+$ . Anal. (%) Calc. para C<sub>34</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 75.66; H, 7.66; N, 7.79. Anal. Exp. (%): C, 75.88; H, 7.80; N, 7.70.

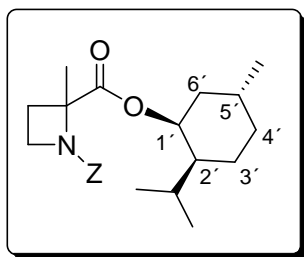


**Pmb-(S)-Azf-Phe-NHChx [(S)-16c]:** Sirupe. Rdto. 55 % [A partir de (**R,S**)-15c]. Eluyente: Et<sub>2</sub>O. HPLC:  $t_R$  = 10.46 min (A:B=40:60). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.25 (d, 1H,  $J=8.4$ , NH-Phe), 7.33-7.10 (m, 10H, Ph), 6.90 (d, 2H,  $J=8.7$ , 2-H y 6-H Pmb), 6.73 (d, 2H,  $J=8.7$ , 3-H y 5-H Pmb), 5.66 (d, 1H,  $J=8.1$ , NH-Chx), 4.56 (c, 1H,  $J=8.4$ ,  $\alpha$ -H, Phe), 3.72 (s, 3H, *p*-OMe), 3.61 (m, 1H, 1'-H), 3.48 (d, 1H,  $J=14.9$ ,

1-CH<sub>2</sub>), 3.42 (d, 1H,  $J=14.1$ , 2-CH<sub>2</sub>), 3.40 (d, 1H,  $J=14.1$ , 2-CH<sub>2</sub>), 3.25 (d, 1H,  $J=14.9$ , 1-CH<sub>2</sub>), 3.08 (m, 2H,  $\beta$ -H, Phe), 2.92 (m, 2H, H-4), 1.96 (m, 1H, H-3), 1.80 (m, 1H, H-3),

1.65 (m, 2H, 2'-H), 1.50 (m, 2H, 4'-H), 1.21 (m, 2H, 3'-H), 1.02 (m, 2H, 3'-H), 0.85 (m, 2H, 2'-H). EM (ES modo positivo): 540.5  $[M+1]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $C_{34}H_{41}N_3O_3$ : C, 75.66; H, 7.66; N, 7.79. Anal. Exp. (%): C, 75.83; H, 7.74; N, 7.71.

### 1.7.3. Síntesis de Z-(R,S)-Aza-2-(+)-mentol [(R,S)-19b]:



A una disolución de Z-Aza-OH (**(R,S)-3b**) (38 mg, 0.15 mmol) en  $CH_2Cl_2$  seco (3 mL) se le adiciona (+)-mentol (0.17 mmol, 27 mg), DCC (0.17 mmol, 35 mg) y DMAP (0.02 mmol, 2 mg). Al cabo de 24 h de agitación a temperatura ambiente, se filtra el precipitado de DCU formado y se evapora el disolvente a sequedad. Se

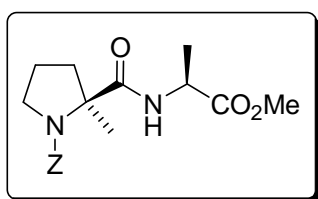
disuelve el residuo en AcOEt y la disolución se lava con  $H_2O$  y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre  $Na_2SO_4$  y se evapora el disolvente a sequedad, purificando el residuo en columna de gel de sílice empleando como sistema de eluyentes gradiente de de 20 a 25 % de AcOEt en hexano. De esta forma se obtiene el compuesto (**(R,S)-19b**) (24 mg, 41 %) como sirupe. HPLC:  $t_R$ = 7.80 min. (A:B=30:70). Proporción de diastereoisómeros 1.7:1. Diastereoisómero mayoritario:  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.23 (m, 5H, Ph), 5.15 (d, 1H,  $J=11.1$ ,  $CH_2-Z$ ), 5.06 (d, 1H,  $J=11.1$ ,  $CH_2-Z$ ), 4.61 (m, 1H, H-1'), 3.97 (m, 1H, H-4), 3.81 (m, 1H, H-4), 2.22 (m, 1H, H-3), 2.10 (m, 1H, H-3), 1.93-1.75 (m, 2H, H-2', H- $^i$ Pr), 1.59 (s, 3H, 2- $CH_3$ ), 1.37 (m, 1H, H-6'), 1.44-0.71 (m, 6H, H-3', H-4', H-5', H-6'), 0.84 (d, 6H,  $J=6.6$ ,  $CH_3$ - $^i$ Pr), 0.74 (d, 3H,  $J=7.0$ , 5'- $CH_3$ ). Diastereoisómero minoritario:  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.23 (m, 5H, Ph), 4.96 (d, 1H,  $J=12.8$ ,  $CH_2-Z$ ), 4.87 (d, 1H,  $J=12.8$ ,  $CH_2-Z$ ), 4.61 (m, 1H, H-1'), 3.97 (m, 1H, H-4), 3.81 (m, 1H, H-4), 2.22 (m, 1H, H-3), 2.10 (m, 1H, H-3), 1.93-1.75 (m, 2H, H-2', H- $^i$ Pr), 1.63 (s, 3H, 2- $CH_3$ ), 1.37 (m, 1H, H-6'), 1.44-0.71 (m, 6H, H-3', H-4', H-5', H-6'), 0.86 (d, 6H,  $J=7.0$ ,  $CH_3$ - $^i$ Pr), 0.74 (d, 3H,  $J=7.0$ , 5'- $CH_3$ ).  $^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ ): Diastereoisómero mayoritario:  $\delta$  171.1 (2-CO), 154.7 (CO-Z), 135.3 (C-Ph), 127.4, 126.8, 126.5 (CH-Ph), 74.3 (1'-C), 67.4 (2-C), 65.6 ( $CH_2-Z$ ), 45.8 (2'-C), 43.8 (4-C), 39.5 (6'-C), 33.1 (4'-C), 30.3 (5'-C), 27.9 (3'-C), 24.8 (CH- $^i$ Pr), 22.2 (3-C), 20.9 (2- $CH_3$ ), 19.8 ( $CH_3$ - $^i$ Pr), 15.0 (5'- $CH_3$ ). Diastereoisómero minoritario:  $\delta$  171.1 (2-CO), 154.7 (CO-Z), 135.9 (C-Ph), 127.4, 126.8, 126.4 (CH-Ph), 74.3 (1'-C), 67.4 (2-C), 65.2 ( $CH_2-Z$ ), 45.8 (2'-C), 45.0 (4-C), 39.5 (6'-C), 33.1 (4'-C), 30.3 (5'-C), 28.7 (3'-C), 25.3



(CH-<sup>i</sup>Pr), 22.2 (3-C), 21.0 (2-CH<sub>3</sub>), 19.8 (CH<sub>3</sub>-<sup>i</sup>Pr), 15.0 (5'-CH<sub>3</sub>). EM (ES modo positivo): 388.3 [M+1]<sup>+</sup>, 410.2 [M+Na]<sup>+</sup>, 797.5 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>4</sub>: C, 71.29; H, 8.58; N, 3.61. Anal. Exp. (%): C, 71.20; H, 8.62; N, 3.70.

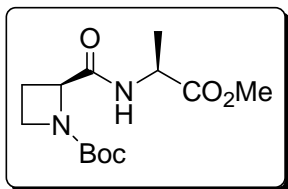
#### 1.7.4. Preparación de derivados dipeptídicos Boc- y Z-Xaa-Ala-OMe y Z-Ala-Xaa-OMe.

*Procedimiento general:* A una disolución del correspondiente aminoácido *N*-protegido (2.92 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (8 mL) se le adiciona el correspondiente α-amino ester (4.09 mmol), BOP (1.81 g, 4.09 mmol) y TEA (1.00 mL, 7.01 mmol). Al cabo de 24 h de agitación a temperatura ambiente la disolución se lava con ácido cítrico al 10 %, NaHCO<sub>3</sub> al 10 %, H<sub>2</sub>O y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a sequedad, purificando el residuo en columna de gel de sílice empleando el sistema de eluyentes indicado en cada caso.

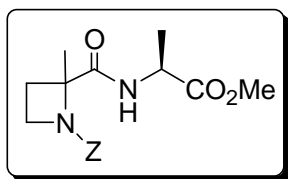


**Z-α-MePro-Ala-OMe (20b):** Sirupe. Rdto. 82 % (A partir de **1b** y H-Ala-OMe·HCl). Gradiente de 25 a 33 % de AcOEt en hexano. HPLC: *t<sub>R</sub>* = 4.69 min (A:B=30:70). [α]<sub>D</sub> = -55.58 (c=1.46, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Proporción de rotámeros 1.7:1. Rotámero

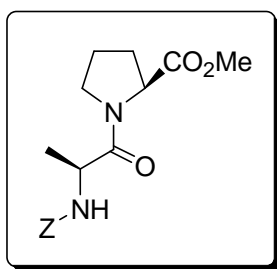
mayoritario: δ 7.51 (s a, 1H, NH-Ala), 7.30 (m, 5H, Ph), 5.18 (d, 1H, *J*=12.5, CH<sub>2</sub>-Z), 5.11 (d, 1H, *J*=12.5, CH<sub>2</sub>-Z), 4.46 (m, 1H, α-H, Ala), 3.73 (s, 3H, OMe), 3.60 (m, 2H, δ-H, Pro), 2.64 (m, 1H, β-H, Pro), 1.81 (m, 3H, β-H, Pro, γ-H, Pro), 1.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-αPro), 1.36 (m, 3H, β-H, Ala), Rotámero minoritario: 7.51 (s a, 1H, NH-Ala), 7.30 (m, 5H, Ph), 5.16 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.46 (m, 1H, α-H, Ala), 3.65 (s, 3H, OMe), 3.60 (m, 2H, δ-H, Pro), 2.27 (m, 1H, β-H, Pro), 1.81 (m, 3H, β-H, Pro, γ-H, Pro), 1.47 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-αPro), 1.27 (m, 3H, β-H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Rotámero mayoritario: δ 173.9 (CO-Pro), 173.3 (CO-OMe), 155.1 (CO-Z), 136.5 (C-Ph), 128.4, 127.9, 127.7 (CH-Ph), 67.1 (α-C, Pro), 66.9 (CH<sub>2</sub>-Z), 52.2 (OMe), 48.5 (δ-C, Pro) 48.3 (α-C, Ala), 38.7 (β-C, Pro), 22.6 (γ-C, Pro), 22.5 (CH<sub>3</sub>-αPro), 17.9 (β-C, Ala). EM (ES modo positivo): 349.2 [M+1]<sup>+</sup>, 371.2 [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C, 62.05; H, 6.94; N, 8.04. Anal. Exp. (%): C, 62.16; H, 6.67; N, 7.89.



**Boc-Azg-Ala-OMe (24a):** Sirupe. Rdto. 93 % [A partir de Boc-Azg-OH (**2a**) y H-Ala-OMe·HCl]. Gradiente de 33 a 66 % de AcOEt en hexano.  $[\alpha]_D = -117.16$  ( $c=1.38$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.40 (m, 1H, NH-Ala), 4.66-4.53 (m, 2H,  $\alpha$ -H, Ala, H-2), 3.84 (m, 2H, H-4), 3.72 (s, 3H, OMe), 2.40 (m, 2H, H-3), 1.44 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ - $^t\text{Bu}$ ), 1.41 (d, 3H,  $J=7.1$ ,  $\beta$ -H, Ala).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.0 (CO-Ala), 171.2 (2-CO), 157.1 (CO-Boc), 81.1 ( $\text{C}$ - $^t\text{Bu}$ ), 62.2 (2-C), 52.4 (OMe), 48.0 ( $\alpha$ -C, Ala), 47.4 (4-C), 28.3 ( $\text{CH}_3$ - $^t\text{Bu}$ ), 19.9 (3-C), 18.4 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 309.2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 595.2  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$ : C, 54.53; H, 7.74; N, 9.78. Anal. Exp. (%): C, 54.37; H, 7.68; N, 9.90.

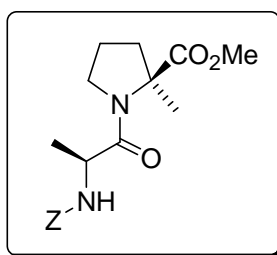


**Z-(*R,S*)-Aza-Ala-OMe [(*R,S*)-25b]:** Sirupe. Rdto. 89 % [A partir de (*R,S*)-**3b** y H-Ala-OMe·HCl]. Eluyente: MeOH: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:90). HPLC:  $t_R = 8.30$  min (A:B=25:75). El espectro de  $^1\text{H}$  RMN de (*R,S*)-**25b** resultó muy complejo, no pudiéndose realizar la asignación de diastereoisómeros y rotámeros.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.23-7.98 (s a, 1H, NH-Ala), 7.37 (m, 5H, Ph), 5.17 (s a, 2H,  $\text{CH}_2$ -Z), 4.53 (q, 1H,  $J=7.2$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.00-3.60 (m, 2H, H-4), 3.75 (s, 3H, OMe), 2.80-2.44 (m, 1H, H-3), 2.05 (m, 1H, H-3), 1.80-1.56 (s a, 3H, 2- $\text{CH}_3$ ), 1.50-1.15 (m, 3H,  $\beta$ -H, Ala).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Diastereoisómero A:  $\delta$  174.1 (2-CO), 173.0 (CO-Ala), 156.7 (CO-Z), 136.1 (C-Ph), 128.5, 128.1, 127.9 (CH-Ph), 70.0 (1-C), 66.9 ( $\text{CH}_2$ -Z), 52.2 (OMe), 48.0 ( $\alpha$ -C, Ala), 44.4 (4-C), 27.3 (3-C), 22.5 (2- $\text{CH}_3$ ), 17.8 ( $\beta$ -C, Ala), Diastereoisómero B:  $\delta$  174.1 (2-CO), 173.0 (CO-Ala), 156.7 (CO-Z), 136.1 (C-Ph), 128.5, 128.1, 127.9 (CH-Ph), 70.0 (1-C), 66.9 ( $\text{CH}_2$ -Z), 52.2 (OMe), 48.0 ( $\alpha$ -C, Ala), 44.4 (4-C), 27.6 (3-C), 22.5 (2- $\text{CH}_3$ ), 17.8 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 335.2  $[\text{M}+1]^+$ , 357.2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$ : C, 61.07; H, 6.63; N, 8.38. Anal. Exp. (%): C, 60.93; H, 6.69; N, 8.49.



**Z-Ala-Pro-OMe (34a):** Sirupe. Rdto. 85 % (A partir de **33a** y Z-Ala-OH). Gradiente de 20 a 50 % de AcOEt en hexano. HPLC:  $t_R$  = 3.20 min (A:B=40:60).  $[\alpha]_D$  = -62.4 ( $c$ =0.74,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Proporción de rotámeros 8.3:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  7.34 (m, 5H, Ph), 5.63 (d, 1H,  $J$ =7.2, NH-Ala), 5.09 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -Z), 4.58-4.48

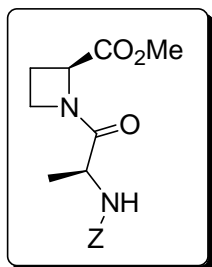
(m, 2H,  $\alpha$ -H, Pro,  $\alpha$ -H, Ala), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.66 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 3.54 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.25-1.85 (m, 4H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.39 (d, 3H,  $J$ =7.2,  $\beta$ -H, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  7.34 (m, 5H, Ph), 5.63 (m, 1H, NH-Ala), 5.09 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -Z), 4.43 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Pro), 4.32 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ala), 3.72 (s, 3H, OMe), 3.47 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.25-1.85 (m, 4H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.31 (d, 3H,  $J$ =6.8,  $\beta$ -H, Ala).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Rotámero mayoritario:  $\delta$  172.3 (CO-Pro), 171.3 (CO-Ala), 155.6 (CO-Z), 136.4 (C-Ph), 128.5, 128.0, 127.9 (CH-Ph), 66.7 ( $\text{CH}_2$ -Z), 58.7 ( $\alpha$ -C, Pro), 52.2 (OMe), 48.3 ( $\alpha$ -C, Ala), 46.8 ( $\delta$ -C, Pro), 28.9 ( $\beta$ -C, Pro), 24.9 ( $\gamma$ -C, Pro), 18.2 ( $\beta$ -C, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  172.3 (CO-Pro), 171.3 (CO-Ala), 155.6 (CO-Z), 136.4 (C-Ph), 128.5, 128.0, 127.9 (CH-Ph), 66.7 ( $\text{CH}_2$ -Z), 59.0 ( $\alpha$ -C, Pro), 52.8 (OMe), 48.3 ( $\alpha$ -C, Ala), 46.5 ( $\delta$ -C, Pro), 31.2 ( $\beta$ -C, Pro), 22.1 ( $\gamma$ -C, Pro), 19.3 ( $\beta$ -C, Ala). MS (ES modo positivo): 335.0  $[\text{M}+1]^+$ , 357.2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$ : C, 61.07; H, 6.63; N, 8.38. Anal. Exp. (%): C, 61.22; H, 6.52; N, 8.40.



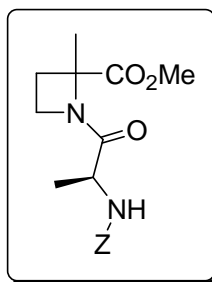
**Z-Ala- $\alpha$ -MePro-OMe (34b):** Sirupe. Rdto. 65 % (A partir de **33b** y Z-Ala-OH). Gradiente de 20 a 50 % de AcOEt en hexano. HPLC:  $t_R$  = 3.49 min (A:B=40:60, DELTA-PAK).  $[\alpha]_D$  = -31.8 ( $c$ =1.46,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.33 (m, 5H, Ph), 5.65 (d, 1H,  $J$ =6.8, NH-Ala), 5.09 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -Z), 4.48 (q, 1H,  $J$ =6.8,  $\alpha$ -H, Ala), 3.75 (m, 1H,

$\delta$ -H, Pro), 3.69 (s, 3H, OMe), 3.59 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.16-1.87 (m, 4H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.58 (s, 3H,  $\alpha$ -CH<sub>3</sub>, Pro), 1.33 (d, 3H,  $J$ =6.8,  $\beta$ -H, Ala).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.9 (CO-Pro), 170.4 (CO-Ala), 155.5 (CO-Z), 136.4 (C-Ph), 128.4, 128.0, 127.9 (CH-Ph), 66.6 ( $\text{CH}_2$ -Z), 66.4 ( $\alpha$ -C, Pro), 52.3 (OMe), 48.5 ( $\alpha$ -C, Ala), 47.8 ( $\delta$ -C, Pro), 38.3 ( $\beta$ -C, Pro), 24.0 ( $\gamma$ -C, Pro), 21.5 ( $\alpha$ -CH<sub>3</sub>, Pro), 17.9 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo

positivo): 349.1  $[M+1]^+$ , 371.1  $[M+Na]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $C_{18}H_{24}N_2O_5$ : C, 62.05; H, 6.94; N, 8.04. Anal. Exp. (%): C, 61.99; H, 6.88; N, 8.11.



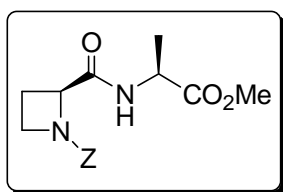
**Z-Ala-Azg-OMe (39a):** Sirupe. Rdto. 64 % (A partir de **12a** y Z-Ala-OH). Gradiente de 20 a 66 % de AcOEt en hexano. HPLC:  $t_R$  = 4.72 min (A:B=30:70).  $[\alpha]_D = -97.2$  ( $c=1.66$ ,  $CHCl_3$ ).  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ): Proporción de rotámeros 3.3:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  7.32 (m, 5H, Ph), 5.50 (d, 1H,  $J=6.8$ , NH-Ala), 5.07 (s, 2H,  $CH_2$ -Z), 4.76 (dd, 1H,  $J=9.5$ , 5.4, H-2, Azg), 4.32-4.19 (m, 3H, H-4,  $\alpha$ -H, Ala), 3.75 (s, 3H, OMe), 2.64 (m, 1H, H-3), 2.41 (m, 1H, H-3), 1.34 (d, 3H,  $J=6.8$ ,  $\beta$ -H, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  7.32 (m, 5H, Ph), 5.50 (m, 1H, NH-Ala), 5.07 (s, 2H,  $CH_2$ -Z), 4.82 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Azg), 4.10 (m, 2H, H-4,  $\alpha$ -H, Ala), 3.81 (m, 1H, H-4), 3.75 (s, 3H, OMe), 2.64 (m, 1H, H-3), 2.41 (m, 1H, H-3), 1.29 (d, 3H,  $J=7.1$ ,  $\beta$ -H, Ala).  $^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ ): Rotámero mayoritario:  $\delta$  172.1 (CO-Ala), 170.8 (2-CO), 155.6 (CO-Z), 136.3 (C-Ph), 128.5, 128.1, 127.9 (CH-Ph), 66.7 ( $CH_2$ -Z), 58.8 (2-C), 52.4 (OMe), 48.8 (4-C), 45.9 ( $\alpha$ -C, Ala), 20.3 (3-C), 18.2 ( $\beta$ -C, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  172.0 (CO-Ala), 170.8 (2-CO), 155.6 (CO-Z), 136.3 (C-Ph), 128.5, 128.1, 127.9 (CH-Ph), 66.7 ( $CH_2$ -Z), 61.5 (2-C), 52.8 (OMe), 46.8 (4-C), 45.9 ( $\alpha$ -C, Ala), 21.1 (3-C), 19.0 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 321.0  $[M+1]^+$ , 343.0  $[M+Na]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $C_{16}H_{20}N_2O_5$ : C, 59.99; H, 6.29; N, 8.74. Anal. Exp. (%): C, 60.11; H, 6.33; N, 8.56.



**Z-Ala-(R,S)-Aza-OMe [(R,S)-39b]:** Sirupe. Rdto. 85 % [A partir de **(R,S)-12b** y Z-Ala-OH]. Eluyente:  $Et_2O$ . HPLC:  $t_R$  = 5.54 min. (A:B=30:70, DELTA-PAK). Proporción de diastereoisómeros 1.1:1.  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ): Diastereoisómero mayoritario:  $\delta$  7.33 (m, 5H, Ph), 5.56 (d, 1H,  $J=7.1$ , NH-Ala), 5.08 (s, 2H,  $CH_2$ -Z), 4.34-4.00 (m, 3H, H-4,  $\alpha$ -H, Ala), 3.73 (s, 3H, OMe), 2.41 (m, 1H, H-3), 2.20 (m, 1H, H-3), 1.70 (s, 3H, 2- $CH_3$ , Aza), 1.31 (d, 3H,  $J=7.1$ ,  $\beta$ -H, Ala), Diastereoisómero minoritario:  $\delta$  7.33 (m, 5H, Ph), 5.62 (d, 1H,  $J=7.0$ , NH-Ala), 5.09 (s, 2H,  $CH_2$ -Z), 4.34-4.00 (m, 3H, H-4,  $\alpha$ -H, Ala), 3.75 (s, 3H, OMe), 2.41 (m, 1H, H-3), 2.20 (m, 1H,

H-3), 1.74 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>, Aza), 1.33 (d, 3H, *J*=7.0, β-H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Diastereoisómero mayoritario: δ 172.2 (2-CO), 171.7 (CO-Ala), 155.5 (CO-Z), 136.4 (C-Ph), 128.4, 128.0, 127.9 (CH-Ph), 67.7 (2-C), 66.7 (CH<sub>2</sub>-Z), 52.6 (OMe), 46.8 (α-C, Ala), 46.4 (4-C), 28.4 (3-C), 22.0 (2-CH<sub>3</sub>, Aza), 17.9 (β-C, Ala), Diastereoisómero minoritario: δ 172.2 (2-CO), 171.3 (CO-Ala), 155.5 (CO-Z), 136.4 (C-Ph), 128.4, 128.0, 127.9 (CH-Ph), 67.6 (2-C), 66.6 (CH<sub>2</sub>-Z), 52.6 (OMe), 46.8 (α-C, Ala), 46.5 (4-C), 28.3 (3-C), 21.8 (2-CH<sub>3</sub>, Aza), 18.6 (β-C, Ala). EM (ES modo positivo): 335.0 [M+1]<sup>+</sup>, 357.0 [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C, 61.07; H, 6.63; N, 8.38. Anal. Exp. (%): C, 60.96; H, 6.75; N, 8.47.

#### Síntesis de Z-Azg-Ala-OMe (25a).

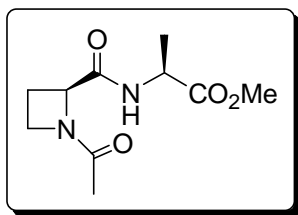


Se disuelve el compuesto **24a** (143 mg, 0.50 mmol) en una disolución de HCl/AcOEt (12 mL, 3.2M) y se agita a temperatura ambiente durante 4 h. Tras evaporar el disolvente se disuelve el crudo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (4 mL), se enfría a 0 °C y se adiciona óxido de propileno (0.53 mL, 7.50 mmol) y cloroformiato de bencilo (0.11 mL, 0.80 mmol). Tras 2 h de reacción a temperatura ambiente se lava la reacción sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10 %, NaHCO<sub>3</sub> al 10 %, H<sub>2</sub>O y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a sequedad, purificando el residuo en cromatografía circular centrífuga utilizando como eluyente un gradiente de 20 a 66 % de AcOEt en hexano. De esta forma se obtienen 98 mg del compuesto **25a** (61 % de Rdto.) en forma de sirupe. HPLC: t<sub>R</sub>= 8.59 min (A:B=20:80). [α]<sub>D</sub>= -77.98 (c=1.06, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.35 (m, 6H, NH-Ala, Ph), 5.18 (d, 1H, *J*=12.2, CH<sub>2</sub>-Z), 5.12 (d, 1H, *J*=12.2, CH<sub>2</sub>-Z), 4.73 (t, 1H, *J*=8.0, H-2), 4.56 (q, 1H, *J*=7.2, α-H, Ala), 3.95 (m, 2H, H-4), 3.73 (s, 3H, OMe), 2.47 (m, 2H, H-3), 1.39 (d, 3H, *J*=7.2, β-H, Ala). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.40 (m, 1H, NH-Ala), 7.32 (m, 5H, Ph), 5.00 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.60 (dd, 1H, *J*=8.7, 5.1, H-2), 4.28 (q, 1H, *J*=7.5, α-H, Ala), 3.88 (m, 2H, H-4), 3.60 (s, 3H, OMe), 2.44 (m, 1H, H-3), 2.00 (m, 1H, H-3), 1.24 (d, 3H, *J*=7.5, β-H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 172.7 (CO-Ala), 170.5 (2-CO), 157.3 (CO-Z), 135.9 (C-Ph), 128.4, 128.1, 127.9 (CH-Ph), 67.1 (CH<sub>2</sub>-Z), 62.1 (2-C), 52.2 (OMe), 47.9 (α-C,

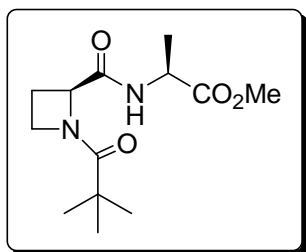
Ala), 47.2 (4-C), 19.9 (3-C), 18.0 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 321.2  $[M+1]^+$ , 343.2  $[M+Na]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $C_{16}H_{20}N_2O_5$ : C, 59.99; H, 6.29; N, 8.74. Anal. Exp. (%): C, 59.91; H, 6.31; N, 8.68.

#### Síntesis de Ac- y Piv-Azg-Ala-OMe.

*Procedimiento general:* Una disolución de Boc-Azg-Ala-OMe (**24a**) (143 mg, 0.50 mmol) en una mezcla HCl/AcOEt (12 mL, 3.2M) se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 4 h. Tras la evaporación del disolvente, el crudo se disuelve en  $CH_2Cl_2$  seco (4 mL) y se enfría a 0 °C bajo atmósfera de argón, con posterior adición de TEA (0.22 mL, 1.55 mmol) y del cloruro de acilo correspondiente (0.80 mmol). Tras 2 h de reacción a temperatura ambiente se lava sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10 %,  $NaHCO_3$  al 10 %,  $H_2O$  y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre  $Na_2SO_4$  y se evapora el disolvente a sequedad, purificando el residuo en columna de gel de sílice en el sistema de eluyentes indicado en cada caso.



**Ac-Azg-Ala-OMe (26a):** Aceite. Rdto. 79 %. Eluyente: MeOH: $CH_2Cl_2$  (1:10) (cromatografía circular centrífuga).  $[\alpha]_D^{25} = -119.28$  ( $c=0.52$ ,  $CHCl_3$ ).  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.28 (m, 1H, NH-Ala), 4.88 (dd, 1H,  $J=9.5, 6.8$ , H-2), 4.50 (q, 1H,  $J=7.1$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.06 (t, 2H,  $J=7.8$ , H-4), 3.73 (s, 3H, OMe), 2.70 (m, 1H, H-3), 2.45 (m, 1H, H-3), 1.92 (s, 3H,  $CH_3$ -CO), 1.41 (d, 3H,  $J=7.1$ ,  $\beta$ -H, Ala).  $^1H$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ): Proporción de rotámeros 1:1. Rotámero A:  $\delta$  8.58 (d, 1H,  $J=7.1$ , NH-Ala), 4.78 (m, 1H, H-2), 4.35 (q, 1H,  $J=7.1$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.02 (t, 2H,  $J=7.6$ , H-4), 3.30 (s, 3H, OMe), 2.36 (m, 1H, H-3), 2.02 (m, 1H, H-3), 1.76 (s, 3H,  $CH_3$ -CO), 1.30 (d, 3H,  $J=7.1$ ,  $\beta$ -H, Ala), Rotámero B:  $\delta$  8.37 (d, 1H,  $J=7.1$ , NH-Ala), 4.59 (m, 1H, H-2), 4.27 (q, 1H,  $J=7.1$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.75 (t, 2H,  $J=7.2$ , H-4), 3.30 (s, 3H, OMe), 2.36 (m, 1H, H-3), 2.02 (m, 1H, H-3), 1.64 (s, 3H,  $CH_3$ -CO), 1.27 (d, 3H,  $J=7.1$ ,  $\beta$ -H, Ala).  $^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  172.7 (CO-Ala), 172.5 (CO- $CH_3$ ), 170.3 (2-CO), 61.6 (2-C), 52.1 (OMe), 50.6 (4-C), 48.5 ( $\alpha$ -C, Ala), 18.7 ( $CH_3$ -CO), 18.0 (3-C), 17.6 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 229.2  $[M+1]^+$ , 251.2  $[M+Na]^+$ , 479.2  $[2M+Na]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $C_{10}H_{16}N_2O_4$ : C, 52.62; H, 7.07; N, 12.27. Anal. Exp. (%): C, 52.81; H, 6.95; N, 12.08.

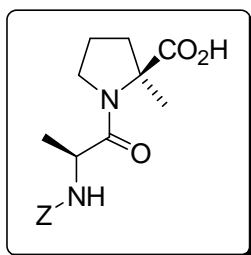


**Piv-Azg-Ala-OMe (27a):** Sirupe. Rdto. 82 %. Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:10) (cromatografía circular centrífuga).  $[\alpha]_D = -98.38$  ( $c=0.62$ , CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.87 (m, 1H, NH-Ala), 4.82 (dd, 1H,  $J=9.5$ , 6.0, H-2), 4.41 (q, 1H,  $J=7.2$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.26 (t, 2H,  $J=8.4$ , H-4), 3.64 (s, 3H, OMe), 2.51 (m, 1H, H-3), 2.35

(m, 1H, H-3), 1.30 (d, 3H,  $J=7.2$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.12 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  8.31 (s a, 1H, NH-Ala), 4.60 (m, 1H, H-2), 4.42-4.05 (m, 3H,  $\alpha$ -H, Ala, H-4), 3.62 (s, 3H, OMe), 2.39 (m, 1H, H-3), 1.95 (m, 1H, H-3), 1.27 (d, 3H,  $J=7.2$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.08 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  179.6 (CO-<sup>t</sup>Bu), 172.8 (CO-Ala), 170.5 (2-CO), 62.4 (2-C), 52.1 (OMe), 51.7 (4-C), 48.0 ( $\alpha$ -C, Ala), 38.4 (C-<sup>t</sup>Bu), 26.8 (CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu), 18.8 (3-C), 17.7 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 271.3 [M+1]<sup>+</sup>, 293.2 [M+Na]<sup>+</sup>, 563.3 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C, 57.76; H, 8.20; N, 10.36. Anal. Exp. (%): C, 57.88; H, 8.01; N, 10.35.

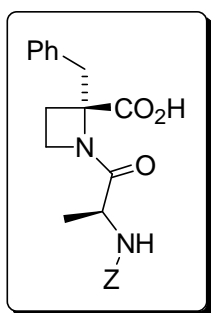
### 1.7.5. Saponificación de dipéptidos con ésteres C-terminales.

*Procedimiento general:* A una disolución del éster metílico del dipéptido correspondiente (1.71 mmol) en MeOH (15 mL) se añade NaOH 2N (2.57 mL, 5.12 mmol). Tras 4 días de reacción a temperatura ambiente se evapora el disolvente y el crudo de reacción se disuelve en H<sub>2</sub>O y se lava con AcOEt. Seguidamente la fase acuosa se acidifica con HCl 1M hasta pH=3, y se extrae con AcOEt. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora a sequedad, rindiendo el correspondiente producto sin más purificación.



**Z-Ala- $\alpha$ -MePro-OH (35b):** Sólido céreo. Rdto. 74 % (A partir de **34b**). HPLC:  $t_R = 4.67$  min (A:B=30:70, DELTA-PAK).  $[\alpha]_D = -40.3$  ( $c=0.88$ , CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.36 (m, 5H, Ph), 5.94 (s a, 1H, COOH), 5.76 (d, 1H,  $J=7.6$ , NH-Ala), 5.11 (s a, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.52 (q, 1H,  $J=7.6$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.78 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 3.61 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.36 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 2.10-1.86 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.62 (s, 3H,  $\alpha$ -CH<sub>3</sub>, Pro), 1.34 (d, 3H,  $J=7.6$ ,  $\beta$ -H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  176.6 (CO-

Pro), 171.7 (CO-Ala), 155.7 (CO-Z), 136.4 (C-Ph), 128.5, 128.0, 127.6 (CH-Ph), 66.9 (CH<sub>2</sub>-Z), 48.9 ( $\alpha$ -C, Ala), 48.2 ( $\delta$ -C, Pro), 38.2 ( $\beta$ -C, Pro), 23.9 ( $\gamma$ -C, Pro), 21.5 ( $\alpha$ -CH<sub>3</sub>, Pro), 17.6 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 348.0 [M+1]<sup>+</sup>, 370.0 [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C, 61.07; H, 6.63; N, 8.38. Anal. Exp. (%): C, 61.00; H, 6.71; N, 8.32.



**Z-Ala-(S)-Azf-OH [(S)-43c]:** Sirupe. Rdto. 84 % [A partir de (S)-39c]. HPLC:  $t_R$  = 8.40 min (A:B=20:80).  $[\alpha]_D = +20.5$  ( $c=0.17$ , CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.33-7.09 (m, 10H, Ph), 5.26 (s a, 1H, NH-Ala), 5.08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.11 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ala), 3.64 (m, 1H, H-4), 3.49 (d, 1H,  $J=13.9$ , 2-CH<sub>2</sub>, Azf), 3.26 (m, 1H, H-4), 2.99 (d, 1H,  $J=13.9$ , 2-CH<sub>2</sub>, Azf), 2.72 (m, 1H, H-3), 2.25 (m, 1H, H-3), 1.24 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala). EM (ES modo positivo): 397.0 [M+1]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C, 66.65; H, 6.10; N, 7.07. Anal. Exp. (%): C, 66.82; H, 6.21; N, 6.91.

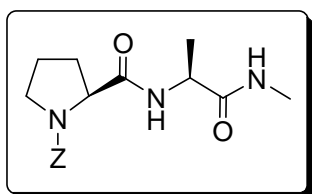
#### 1.7.6. Preparación de derivados dipeptídicos con grupos amida C-terminales.

**Método A:** Se disuelve el correspondiente dipéptido con grupo éster C-terminal (4.22 mmol) en MeNH<sub>2</sub>-EtOH (10 mL, 8M) y se deja reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. En los casos en que fue necesario se purificó la reacción en columna de gel de sílice o en cromatografía circular centrífuga, utilizando el sistema de eluyentes que se indica en cada caso.

**Método B:** A una disolución del correspondiente aminoácido N-prottegido (0.38 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) se le adiciona H-Ala-NHMe (97 mg, 0.95 mmol), BOP (219 mg, 0.49 mmol) y TEA (0.07 mL, 0.49 mmol). Al cabo de 24 h de agitación a temperatura ambiente la disolución se lava con ácido cítrico al 10 %, NaHCO<sub>3</sub> al 10 %, H<sub>2</sub>O y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a sequedad, purificando el residuo en columna de gel de sílice empleando el sistema de eluyentes indicado en cada caso.



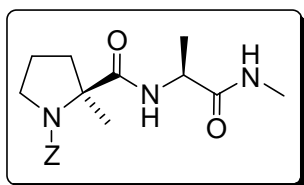
**Método C:** A una disolución del correspondiente dipéptido con el ácido carboxílico C-terminal libre (0.34 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se añade la correspondiente amina ( $\text{MeNH}_2\cdot\text{HCl}$  o  $^i\text{PrNH}_2$ , 3.40 mmol), BOP (195 mg, 0.44 mmol), se enfría a 0 °C y se añade TEA (3.74 mmol para  $\text{MeNH}_2\cdot\text{HCl}$  y 0.44 mmol para  $^i\text{PrNH}_2$ ). Después de 6 días de agitación a temperatura ambiente se lava el crudo con ácido cítrico al 10 %,  $\text{NaHCO}_3$  al 10 %,  $\text{H}_2\text{O}$  y disolución saturada de  $\text{NaCl}$ . La fase orgánica se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evapora el disolvente a sequedad, purificando el residuo en columna de gel de sílice utilizando el sistema de eluyentes apropiado en cada caso.



**Z-Pro-Ala-NHMe (21a):** Sólido. P.f. 129-131 °C. Rdto. 100 % (A partir de **20a**, *Método A*). HPLC:  $t_R$  = 9.55 min (rot. mayoritario) y 8.21 min (rot. minoritario) (A:B=15:85).  $[\alpha]_D = -89.12$  ( $c=1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Proporción de rotámeros 2.6:1. Rotámero

mayoritario:  $\delta$  7.25 (m, 5H, Ph), 6.95 (d, 1H,  $J=7.2$ , NH-Ala), 6.86 (s a, 1H, NH- $\text{CH}_3$ ), 5.05 (s a, 2H,  $\text{CH}_2$ -Z), 4.38 (q, 1H,  $J=7.2$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.25 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Pro), 3.45 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.65 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ -NH), 2.04 (m, 2H,  $\beta$ -H, Pro), 1.83 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Pro), 1.25 (d, 3H,  $J=7.2$ ,  $\beta$ -H, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  7.25 (m, 5H, Ph), 6.95 (m, 1H, NH-Ala), 6.86 (s a, 1H, NH- $\text{CH}_3$ ), 5.05 (s a, 2H,  $\text{CH}_2$ -Z), 4.38 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ala), 4.25 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Pro), 3.45 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.58 (s a, 3H,  $\text{CH}_3$ -NH), 2.04 (m, 2H,  $\beta$ -H, Pro), 1.83 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Pro), 1.15 (s a, 3H,  $\beta$ -H, Ala).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): Proporción de rotámeros 1.15:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  8.02 (m, 1H, NH-Ala), 7.71 (m, 1H, NH- $\text{CH}_3$ ), 7.33 (m, 5H, Ph), 5.06 (d, 1H,  $J=12.8$ ,  $\text{CH}_2$ -Z), 4.94 (d, 1H,  $J=12.8$ ,  $\text{CH}_2$ -Z), 4.25 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Pro), 4.19 (q, 1H,  $J=7.2$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.40 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.55 (s a, 3H,  $\text{CH}_3$ -NH), 2.10 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.82 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.06 (d, 3H,  $J=7.2$ ,  $\beta$ -H, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  8.02 (m, 1H, NH-Ala), 7.62 (m, 1H, NH- $\text{CH}_3$ ), 7.33 (m, 5H, Ph), 5.05 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -Z), 4.19 (m, 1H,  $J=7.2$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.17 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Pro), 3.40 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.55 (s a, 3H,  $\text{CH}_3$ -NH), 2.10 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.82 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.18 (d, 3H,  $J=7.2$ ,  $\beta$ -H, Ala).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Rotámero mayoritario:  $\delta$  172.5 (CO-Ala), 171.6 (CO-Pro), 155.8 (CO-Z), 136.1 (C-Ph), 128.3, 128.0, 127.6 (CH-Ph), 67.2 ( $\text{CH}_2$ -Z), 60.8 ( $\alpha$ -C, Pro), 48.7 ( $\alpha$ -C, Ala), 47.0 ( $\delta$ -C, Pro), 29.3 ( $\beta$ -C, Pro), 26.0 ( $\text{CH}_3$ -NH), 24.4 ( $\gamma$ -C, Pro), 17.8 ( $\beta$ -C, Ala),

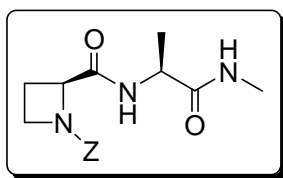
Rotámero minoritario:  $\delta$  172.1 (CO-Ala), 171.6 (CO-Pro), 154.6 (CO-Z), 136.1 (C-Ph), 128.3, 128.2, 127.6 (CH-Ph), 67.2 (CH<sub>2</sub>-Z), 60.4 ( $\alpha$ -C, Pro), 48.7 ( $\alpha$ -C, Ala), 47.3 ( $\delta$ -C, Pro), 31.1 ( $\beta$ -C, Pro), 26.0 (CH<sub>3</sub>-NH), 23.5 ( $\gamma$ -C, Pro), 18.2 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 334.0 [M+1]<sup>+</sup>, 356.0 [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 61.25; H, 6.95; N, 12.60. Anal. Exp. (%): C, 61.44; H, 6.88; N, 12.80.



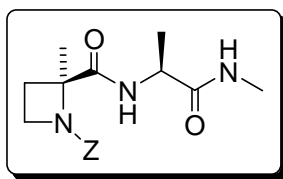
**Z- $\alpha$ -MePro-Ala-NHMe (21b):** Sirupe. Rdto. 82 % (A partir de **20b**, Método A). Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:20). HPLC:  $t_R$  = 11.47 min (A:B=20:80).  $[\alpha]_D$  = -31.14 ( $c$ =0.97, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

Proporción de rotámeros 6.1:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  7.34 (m, 5H, Ph), 7.02 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 6.23 (d, 1H,  $J$ =7.4, NH-Ala), 5.18 (d, 1H,  $J$ =12.4, CH<sub>2</sub>-Z), 5.08 (d, 1H,  $J$ =12.4, CH<sub>2</sub>-Z), 4.42 (q, 1H,  $J$ =7.4,  $\alpha$ -H, Ala), 3.63 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.71 (d, 3H,  $J$ =4.5, CH<sub>3</sub>-NH), 2.22 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.98-1.86 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>- $\alpha$ Pro), 1.30 (d, 3H,  $J$ =7.4,  $\beta$ -H, Ala). Rotámero minoritario:  $\delta$  7.34 (m, 5H, Ph), 6.44 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 6.23 (d, 2H,  $J$ =7.4, NH-Ala), 5.17 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.42 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ala), 3.63 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.71 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-NH), 2.22 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.98-1.86 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>- $\alpha$ Pro), 1.30 (m, 3H,  $\beta$ -H, Ala). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ): Proporción de rotámeros 2.9:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  7.91 (d, 1H,  $J$ =7.5, NH-Ala), 7.42-7.20 (m, 6H, NH-CH<sub>3</sub>, Ph), 5.12 (d, 1H,  $J$ =12.9, CH<sub>2</sub>-Z), 5.05 (d, 1H,  $J$ =12.9, CH<sub>2</sub>-Z), 4.19 (q, 1H,  $J$ =7.5,  $\alpha$ -H, Ala), 3.63 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 3.51 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.51 (d, 3H,  $J$ =4.6, CH<sub>3</sub>-NH), 2.10 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.95-1.70 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>- $\alpha$ Pro), 1.21 (d, 3H,  $J$ =7.5,  $\beta$ -H, Ala). Rotámero minoritario:  $\delta$  7.60 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 7.54 (d, 1H,  $J$ =7.4, NH-Ala), 7.42-7.20 (m, 5H, Ph), 5.05 (d, 1H,  $J$ =12.9, CH<sub>2</sub>-Z), 4.89 (d, 1H,  $J$ =12.9, CH<sub>2</sub>-Z), 4.19 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ala), 3.51 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 3.20 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.51 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-NH), 2.10 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.95-1.70 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>- $\alpha$ Pro), 1.13 (d, 3H,  $J$ =7.4, CH<sub>3</sub>-Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Rotámero mayoritario:  $\delta$  173.4 (CO- $\alpha$ Pro), 172.5 (CO-Ala), 155.0 (CO-Z), 136.3 (C-Ph), 128.6, 128.3, 127.7 (CH-Ph), 68.7 ( $\alpha$ -C, Pro), 67.3 (CH<sub>2</sub>-Z), 49.1 ( $\alpha$ -C, Ala), 47.8 ( $\delta$ -C, Pro), 39.3 ( $\beta$ -C, Pro), 26.2 (CH<sub>3</sub>-NH), 23.0 ( $\gamma$ -C, Pro), 21.1

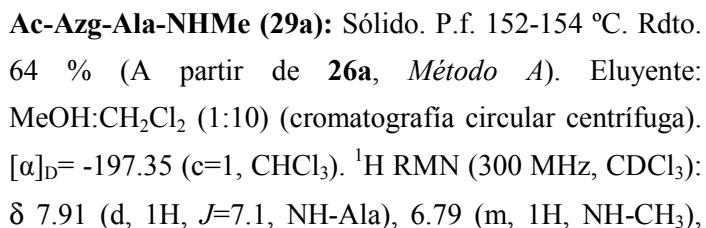
(CH<sub>3</sub>-αPro), 17.8 (β-C, Ala), Rotámero minoritario: δ 173.4 (CO-αPro), 172.5 (CO-Ala), 155.0 (CO-Z), 136.3 (C-Ph), 128.6, 128.3, 127.7 (CH-Ph), 68.7 (α-C, Pro), 67.0 (CH<sub>2</sub>-Z), 49.1 (α-C, Ala), 47.8 (δ-C, Pro), 39.3 (β-C, Pro), 26.2 (CH<sub>3</sub>-NH), 23.0 (γ-C, Pro), 21.1 (CH<sub>3</sub>-αPro), 17.8 (β-C, Ala). EM (ES modo positivo): 348.0 [M+1]<sup>+</sup>, 370.0 [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 62.23; H, 7.25; N, 12.10. Anal. Exp. (%): C, 62.09; H, 7.33; N, 12.19.



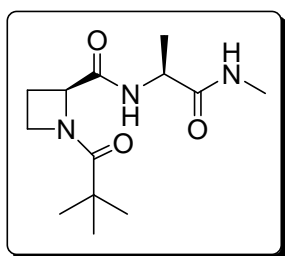
**Z-Azg-Ala-NHMe (28a):** Sólido blanco. P.f. 172-174 °C. Rdto. 99 % (A partir de **25a**, *Método A*). HPLC: t<sub>R</sub>= 6.93 min (A:B=15:85). [α]<sub>D</sub>= -102.25 (c=0.40, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.26 (m, 6H, NH-Ala, Ph), 6.71 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 5.07 (d, 1H, J=12.3, CH<sub>2</sub>-Z), 5.01 (d, 1H, J=12.3, CH<sub>2</sub>-Z), 4.63 (t, 1H, J=7.7, H-2), 4.41 (q, 1H, J=7.0, α-H, Ala), 3.85 (m, 2H, H-4), 2.65 (d, 3H, J=4.3, CH<sub>3</sub>-NH), 2.35 (m, 2H, H-3), 1.28 (d, 3H, J=7.0, β-H, Ala). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.09 (d, 1H, J=7.2, NH-Ala), 7.78 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 7.32 (m, 5H, Ph), 5.01 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.63 (dd, 1H, J=8.4, 5.2, H-2), 4.24 (q, 1H, J=7.2, α-H, Ala), 3.87 (m, 2H, H-4), 2.56 (d, 3H, J=4.6, CH<sub>3</sub>-NH), 2.40 (m, 1H, H-3), 2.04 (m, 1H, H-3), 1.15 (m, 3H, β-H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 172.3 (CO-Ala), 170.7 (2-CO), 157.3 (CO-Z), 135.7 (C-Ph), 128.4, 128.2, 127.9 (CH-Ph), 67.2 (CH<sub>2</sub>-Z), 62.1 (2-C), 48.7 (α-C, Ala), 47.3 (4-C), 25.8 (CH<sub>3</sub>-NH), 20.2 (3-C), 18.0 (β-C, Ala). EM (ES modo positivo): 320.0 [M+1]<sup>+</sup>, 342.0 [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 60.17; H, 6.63; N, 13.16. Anal. Exp. (%): C, 60.26; H, 6.44; N, 13.06.



**Z-(S)-Aza-Ala-NHMe [(S)-28b]:** Sirupe. Rdto. 90 % [A partir de **(S)-3b** y H-Ala-NHMe·HCl, *Método B*] y 14 % [A partir de **(R,S)-25b**, *Método A*]. Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:60). HPLC: t<sub>R</sub>= 16.03 min (rot. minoritario) y 18.75 min (rot. mayoritario) (A:B=15:85). [α]<sub>D</sub>= -113.13 (c=0.98, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Proporción de rotámeros 5:1. Rotámero mayoritario: δ 7.74 (m, 1H, NH-Ala), 7.30 (m, 5H, Ph), 6.38 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 5.08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.34 (q, 1H, J=7.1, α-H, Ala), 3.89 (m, 1H, H-4), 3.74 (m, 1H, H-4), 2.72 (d, 3H, J=3.8, CH<sub>3</sub>-NH), 2.60 (m, 1H, H-3), 1.98 (m, 1H, H-3), 1.64 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.30 (d,

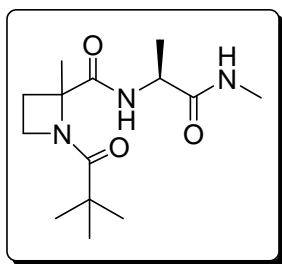


NH-CH<sub>3</sub>), 4.80 (dd, 1H,  $J=9.0$ ,  $J=5.1$ , H-2), 4.29 (q, 1H,  $J=7.3$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.73 (t, 2H,  $J=7.6$ , H-4), 2.56 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-NH), 2.38 (m, 1H, H-3), 2.04 (m, 1H, H-3), 1.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.20 (d, 3H,  $J=7.3$ ,  $\beta$ -H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Rotámero mayoritario:  $\delta$  172.7 (CO-CH<sub>3</sub>), 172.5 (CO-Ala), 170.5 (2-CO), 61.6 (2-C), 49.0 ( $\alpha$ -C, Ala), 48.5 (4-C), 26.1 (CH<sub>3</sub>-NH), 18.8 (CH<sub>3</sub>-CO), 18.4 (3-C), 17.6 ( $\beta$ -C, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  172.7 (CO-CH<sub>3</sub>), 172.5 (CO-Ala), 171.0 (2-CO), 63.0 (2-C), 51.3 ( $\alpha$ -C, Ala), 46.2 (4-C), 26.1 (CH<sub>3</sub>-NH), 18.8 (CH<sub>3</sub>-CO), 18.6 (3-C), 17.9 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 228.1 [M+1]<sup>+</sup>, 250.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 477.2 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 50.02; H, 7.91; N, 16.80. Anal. Exp. (%): C, 49.94; H, 7.81; N, 16.98.

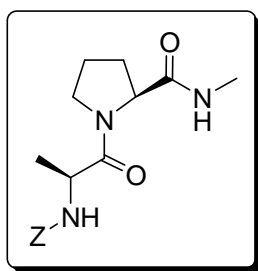


**Piv-Azg-Ala-NHMe (30a):** Sólido blanco. P.f. 125-127 °C. Rdto. 93 % (A partir de **27a**, *Método A*). Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:20).  $[\alpha]_D^{25}$  = -153.25 ( $c=1$ , CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.60 (m, 1H, NH-Ala), 6.80 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.78 (m, 1H, H-2), 4.36 (q, 1H,  $J=7.1$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.28 (t, 1H,  $J=7.8$ , H-4), 2.81 (d, 3H,  $J=4.8$ ,

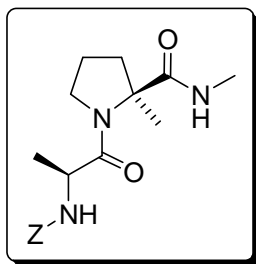
CH<sub>3</sub>-NH), 2.55 (m, 2H, H-3), 1.40 (d, 3H,  $J=7.1$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.24 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  7.99 (m, 1H, NH-Ala), 7.75 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.59 (m, 1H, H-2), 4.24 (m, 3H,  $\alpha$ -H, Ala, H-4), 2.56 (d, 3H,  $J=4.6$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.38 (m, 1H, H-3), 2.05 (m, 1H, H-3), 1.18 (d, 3H,  $J=7.1$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.08 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  179.8 (CO-<sup>t</sup>Bu), 172.4 (CO-Ala), 170.8 (2-CO), 62.4 (2-C), 51.8 (4-C), 48.5 ( $\alpha$ -C, Ala), 38.6 (C-<sup>t</sup>Bu), 29.5 (CH<sub>3</sub>-NH), 26.9 (CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu), 19.3 (3-C), 17.6 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 270.0 [M+1]<sup>+</sup>, 292.0 [M+Na]<sup>+</sup>, 561.3 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 57.97; H, 8.61; N, 15.60. Anal. Exp. (%): C, 58.04; H, 8.91; N, 15.87.



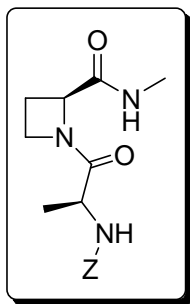
**Piv-(*R,S*)-Aza-Ala-NHMe [(*R,S*)-30b]:** Sirupe. Rdto. 88 % [A partir de (*R,S*)-14b y H-Ala-NHMe·HCl, *Método B*]. Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:30). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Proporción de diastereoisómeros 1.2:1. Diastereoisómero mayoritario: δ 8.18 (d, 1H, *J*=7.3, NH-Ala), 6.55 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.40 (q, 1H, *J*=7.3, α-H, Ala), 4.30 (m, 2H, H-4), 2.77 (d, 3H, *J*=4.9, CH<sub>3</sub>-NH), 2.04 (m, 2H, H-3), 1.74 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.37 (d, 3H, *J*=7.3, β-H, Ala), 1.20 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu). Diastereoisómero minoritario: δ 7.88 (d, 1H, *J*=7.3, NH-Ala), 6.72 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.40 (q, 1H, *J*=7.3, α-H, Ala), 4.30 (m, 2H, H-4), 2.77 (d, 3H, *J*=4.9, CH<sub>3</sub>-NH), 2.04 (m, 2H, H-3), 1.74 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.40 (d, 3H, *J*=7.3, β-H, Ala), 1.19 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Diastereoisómero mayoritario: δ 8.07 (d, 1H, *J*=7.2, NH-Ala), 7.71 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.29 (m, 2H, H-4), 4.21 (q, 1H, *J*=7.2, α-H, Ala), 2.57 (d, 3H, *J*=4.6, CH<sub>3</sub>-NH), 2.40 (m, 1H, H-3), 1.90 (m, 1H, H-3), 1.55 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.21 (d, 3H, *J*=7.2, β-H, Ala), 1.12 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu). Diastereoisómero minoritario: δ 7.95 (d, 1H, *J*=7.2, NH-Ala), 7.82 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.29 (m, 2H, H-4), 4.21 (q, 1H, *J*=7.2, α-H, Ala), 2.57 (d, 3H, *J*=4.6, CH<sub>3</sub>-NH), 2.40 (m, 1H, H-3), 1.90 (m, 1H, H-3), 1.60 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.21 (d, 3H, *J*=7.2, β-H, Ala), 1.12 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Diastereoisómero mayoritario: δ 179.6 (CO-<sup>t</sup>Bu), 174.1 (2-CO), 172.6 (CO-Ala), 72.0 (2-C), 49.4 (4-C), 49.1 (α-C, Ala), 38.9 (C-<sup>t</sup>Bu), 27.7 (3-C), 26.7 (CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu), 26.3 (CH<sub>3</sub>-NH), 22.5 (2-CH<sub>3</sub>), 17.4 (β-C, Ala). Diastereoisómero minoritario: δ 179.5 (CO-<sup>t</sup>Bu), 173.6 (2-CO), 172.6 (CO-Ala), 71.4 (2-C), 49.8 (4-C), 49.3 (α-C, Ala), 38.8 (C-<sup>t</sup>Bu), 27.4 (3-C), 26.7 (CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu), 26.3 (CH<sub>3</sub>-NH), 22.4 (2-CH<sub>3</sub>), 17.3 (β-C, Ala). EM (ES modo positivo): 284.0 [M+1]<sup>+</sup>, 306.0 [M+Na]<sup>+</sup>, 589.3 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 59.34; H, 8.89; N, 14.83. Anal. Exp. (%): C, 59.04; H, 8.96; N, 14.90.



**Z-Ala-Pro-NHMe (36a):** Sólido. P.f. 126-128 °C. Rdto. 97 % (A partir de **34a**, *Método A*). Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:30). HPLC:  $t_R$  = 2.51 min (A:B=40:60).  $[\alpha]_D^{25}$  = -112.3 (c=0.98, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Proporción de rotámeros 6:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  7.30 (m, 5H, Ph), 6.74 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 5.65 (m, 1H, NH-Ala), 5.09 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.62-4.50 (m, 2H,  $\alpha$ -H, Pro,  $\alpha$ -H, Ala), 3.62 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.77 (d, 3H,  $J$ =4.9, CH<sub>3</sub>-NH), 2.38 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 2.13 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Pro), 2.02 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Pro), 1.89 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.35 (d, 3H,  $J$ =6.8,  $\beta$ -H, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  7.30 (m, 5H, Ph), 7.17 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 5.65 (m, 1H, NH-Ala), 5.14 (d, 1H,  $J$ =12.4, CH<sub>2</sub>-Z), 5.02 (d, 1H,  $J$ =12.4, CH<sub>2</sub>-Z), 4.28 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Pro), 4.12 (q, 1H,  $J$ =6.8,  $\alpha$ -H, Ala), 3.62 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.81 (d, 3H,  $J$ =4.9, CH<sub>3</sub>-NH), 2.50 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 2.20-1.75 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.28 (d, 3H,  $J$ =6.8,  $\beta$ -H, Ala). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Proporción de rotámeros 5.3:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  7.69 (c, 1H,  $J$ =4.6, NH-CH<sub>3</sub>), 7.50 (d, 1H,  $J$ =7.3, NH-Ala), 7.33 (m, 5H, Ph), 5.00 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.31 (q, 1H,  $J$ =7.3,  $\alpha$ -H, Ala), 4.21 (dd, 1H,  $J$ =8.2, 3.8,  $\alpha$ -H, Pro), 3.58 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.55 (d, 3H,  $J$ =4.6, CH<sub>3</sub>-NH), 2.01 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 2.00-1.71 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.19 (d, 3H,  $J$ =7.3,  $\beta$ -H, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  8.03 (c, 1H,  $J$ =4.6, NH-CH<sub>3</sub>), 7.33 (m, 5H, Ph), 7.16 (m, 1H, NH-Ala), 5.01 (d, 1H,  $J$ =12.7, CH<sub>2</sub>-Z), 4.98 (d, 1H,  $J$ =12.7, CH<sub>2</sub>-Z), 4.20-4.02 (m, 2H,  $\alpha$ -H, Pro,  $\alpha$ -H, Ala), 3.58 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.58 (d, 3H,  $J$ =4.6, CH<sub>3</sub>-NH), 2.01 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 2.00-1.71 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.16 (d, 3H,  $J$ =6.9,  $\beta$ -H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Rotámero mayoritario:  $\delta$  172.6 (CO-Ala), 171.4 (CO-Pro), 155.6 (CO-Z), 136.3 (C-Ph), 128.5, 128.1, 128.0 (CH-Ph), 66.8 (CH<sub>2</sub>-Z), 59.8 ( $\alpha$ -C, Pro), 48.2 ( $\alpha$ -C, Ala), 47.2 ( $\delta$ -C, Pro), 27.2 ( $\beta$ -C, Pro), 26.2 (CH<sub>3</sub>-NH), 25.1 ( $\gamma$ -C, Pro), 18.4 ( $\beta$ -C, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  172.1 (CO-Ala), 171.0 (CO-Pro), 156.4 (CO-Z), 136.3 (C-Ph), 128.5, 128.1, 128.0 (CH-Ph), 67.0 (CH<sub>2</sub>-Z), 60.9 ( $\alpha$ -C, Pro), 49.0 ( $\alpha$ -C, Ala), 46.9 ( $\delta$ -C, Pro), 31.6 ( $\beta$ -C, Pro), 26.5 (CH<sub>3</sub>-NH), 22.0 ( $\gamma$ -C, Pro), 17.0 ( $\beta$ -C, Ala). MS (ES modo positivo): 334.2 [M+1]<sup>+</sup>, 356.0 [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 61.25; H, 6.95; N, 12.60. Anal. Exp. (%): C, 61.24; H, 7.00; N, 12.53.



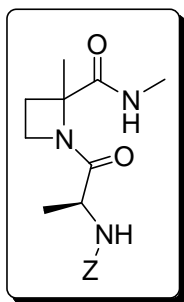
**Z-Ala- $\alpha$ -MePro-NHMe (36b):** Sirupe. Rdto. 80 % (A partir de **35b**, *Método C*). Eluyentes: Acetona:AcOEt (1:6). HPLC:  $t_R = 3.25$  min (A:B=25:75).  $[\alpha]_D = -87.0$  ( $c=0.83$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.32 (m, 5H, Ph), 6.79 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 5.59 (d, 1H,  $J=7.3$ , NH-Ala), 5.07 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.46 (q, 1H,  $J=7.3$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.70 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 3.58 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.76 (d, 3H,  $J=4.6$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.56 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.91 (q, 2H,  $J=6.7$ ,  $\gamma$ -H, Pro), 1.68 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.62 (s, 3H,  $\alpha$ -CH<sub>3</sub>, Pro), 1.32 (d, 3H,  $J=7.3$ ,  $\beta$ -H, Ala).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  7.47 (d, 1H,  $J=7.0$ , NH-Ala), 7.32 (m, 6H, NH-CH<sub>3</sub>, Ph), 4.99 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.28 (q, 1H,  $J=7.0$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.59 (t, 2H,  $J=6.0$ ,  $\delta$ -H, Pro), 2.51 (d, 3H,  $J=4.1$ , CH<sub>3</sub>-NH), 1.94-1.67 (m, 4H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.38 (s, 3H,  $\alpha$ -CH<sub>3</sub>, Pro), 1.14 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  174.0 (CO-Pro), 171.7 (CO-Ala), 155.5 (CO-Z), 136.2 (C-Ph), 128.3, 127.9, 127.8 (CH-Ph), 68.2 ( $\alpha$ -C, Pro), 66.5 (CH<sub>2</sub>-Z), 48.7 ( $\delta$ -C, Pro), 48.6 ( $\alpha$ -C, Ala), 38.2 ( $\beta$ -C, Pro), 26.4 (CH<sub>3</sub>-NH), 23.3 ( $\gamma$ -C, Pro), 22.1 ( $\alpha$ -CH<sub>3</sub>, Pro), 17.8 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 348.2  $[\text{M}+1]^+$ , 370.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4$ : C, 62.23; H, 7.25; N, 12.10. Anal. Exp. (%): C, 62.12; H, 7.13; N, 12.21.



**Z-Ala-Azg-NHMe (40a):** Sólido. P.f. 125-127 °C. Rdto. 95 % (A partir de **39a**, *Método A*). Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:30). HPLC:  $t_R = 2.37$  min (A:B=30:70).  $[\alpha]_D = -131.8$  ( $c=0.42$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Proporción de rotámeros 6.7:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  7.32 (m, 6H, Ph, NH-CH<sub>3</sub>), 5.41 (d, 1H,  $J=7.1$ , NH-Ala), 5.09 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.87 (dd, 1H,  $J=9.3$ , 6.5, H-2), 4.33-4.21 (m, 2H, H-4,  $\alpha$ -H, Ala), 4.06 (m, 1H, H-4), 2.81 (d, 3H,  $J=4.8$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.72 (m, 1H, H-3), 2.51 (m, 1H, H-3), 1.31 (d, 3H,  $J=7.1$ ,  $\beta$ -H, Ala). Rotámero minoritario:  $\delta$  7.32 (m, 6H, Ph, NH-CH<sub>3</sub>), 5.41 (m, 1H, NH-Ala), 5.09 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.84 (m, 1H, H-2), 4.33-4.21 (m, 2H, H-4,  $\alpha$ -H, Ala), 4.06 (m, 1H, H-4), 2.87 (d, 3H,  $J=4.8$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.72 (m, 1H, H-3), 2.51 (m, 1H, H-3), 1.31 (m, 3H,  $\beta$ -H, Ala).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): Proporción de rotámeros 4:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  7.81 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 7.57 (d, 1H,  $J=7.0$ , NH-Ala), 7.35 (m, 5H, Ph), 5.02 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.51 (dd, 1H,  $J=9.0$ , 6.1, H-2), 4.21-4.01 (m, 3H, H-4,  $\alpha$ -H, Ala), 2.60 (d, 3H,

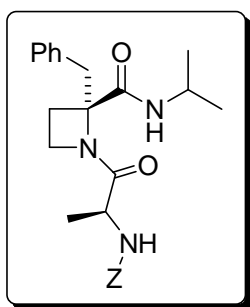


$J=4.4$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.36 (m, 1H, H-3), 2.07 (m, 1H, H-3), 1.17 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  8.11 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 7.35 (m, 6H, Ph, NH-Ala), 5.02 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.76 (m, 1H, H-2), 4.21-3.81 (m, 3H, H-4,  $\alpha$ -H, Ala), 2.60 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-NH), 2.36 (m, 1H, H-3), 2.07 (m, 1H, H-3), 1.17 (m, 3H,  $\beta$ -H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Rotámero mayoritario:  $\delta$  174.5 (CO-Ala), 170.9 (2-CO), 155.7 (CO-Z), 136.1 (C-Ph), 128.5, 128.2, 128.0 (CH-Ph), 67.0 (CH<sub>2</sub>-Z), 62.0 (2-C), 48.8 (4-C), 46.2 ( $\alpha$ -C, Ala), 26.2 (CH<sub>3</sub>-NH), 18.8 (3-C), 18.2 ( $\beta$ -C, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  174.5 (CO-Ala), 170.9 (2-CO), 156.0 (CO-Z), 136.1 (C-Ph), 128.5, 128.2, 128.0 (CH-Ph), 67.0 (CH<sub>2</sub>-Z), 63.1 (2-C), 48.8 (4-C), 46.3 ( $\alpha$ -C, Ala), 26.2 (CH<sub>3</sub>-NH), 18.8 (3-C), 18.5 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 342.0 [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 60.17; H, 6.63; N, 13.16. Anal. Exp. (%): C, 60.10; H, 6.70; N, 13.08.



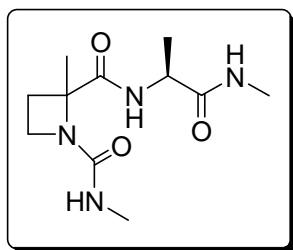
**Z-Ala-(*R,S*)-Aza-NHMe [(*R,S*)-40b]:** Sirupe. Rdto. 99 % [A partir de (*R,S*)-39b, Método A]. Eluyente: AcOEt:hexano (8:1). HPLC:  $t_R$  = 22.9 min (Diastereoisómero mayoritario, CHIRAL-PAK), 30.5 min. (Diastereoisómero minoritario, CHIRAL-PAK). Proporción de diastereoisómeros 1.2:1. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Diastereoisómero mayoritario:  $\delta$  7.87 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 7.35 (m, 5H, Ph), 5.42 (m, 1H, NH-Ala), 5.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.21 (q, 1H,  $J=7.1$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.17 (m, 1H, H-4), 3.97 (m, 1H, H-4), 2.88 (m, 1H, H-3), 2.79 (d, 3H,  $J=4.7$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.12 (m, 1H, H-3), 1.72 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>, Aza), 1.30 (d, 3H,  $J=7.1$ ,  $\beta$ -H, Ala), Diastereoisómero minoritario:  $\delta$  7.93 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 7.35 (m, 5H, Ph), 5.42 (m, 1H, NH-Ala), 5.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.17 (m, 1H, H-4), 4.13 (q, 1H,  $J=7.0$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.97 (m, 1H, H-4), 2.88 (m, 1H, H-3), 2.80 (d, 3H,  $J=4.5$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.12 (m, 1H, H-3), 1.73 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>, Aza), 1.34 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Diastereoisómero mayoritario: 7.75 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 7.59 (d, 1H,  $J=7.0$ , NH-Ala), 7.33 (m, 5H, Ph), 5.00 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.15 (m, 1H, H-4), 4.00 (m, 1H, H-4), 3.96 (q, 1H,  $J=7.0$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 2.60 (d, 3H,  $J=4.3$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.26 (m, 1H, H-3), 2.01 (m, 1H, H-3), 1.52 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>, Aza), 1.14 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala), Diastereoisómero minoritario: 7.67-7.65 (m, 2H, NH-CH<sub>3</sub>, NH-Ala), 7.33 (m, 5H, Ph), 5.02 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Z), 4.15 (m, 1H, H-4), 4.00 (m, 1H, H-4), 3.96 (q, 1H,  $J=7.0$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 2.57 (d, 3H,  $J=4.3$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.26 (m, 1H, H-3), 2.01 (m, 1H, H-3), 1.52 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>, Aza), 1.15 (d, 3H,

$J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala).  $^{13}\text{C}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Diastereoisómero mayoritario:  $\delta$  174.4 (CO-Ala), 172.6 (2-CO), 155.6 (CO-Z), 136.2 (C-Ph), 128.5, 128.2, 128.0 (CH-Ph), 72.0 (2-C), 66.9 ( $\text{CH}_2$ -Z), 46.5 ( $\alpha$ -C, Ala), 45.8 (4-C), 27.0 (3-C), 26.2 ( $\text{CH}_3$ -NH), 23.4 (2- $\text{CH}_3$ , Aza), 18.2 ( $\beta$ -C, Ala), Diastereoisómero minoritario: 174.0 (CO-Ala), 173.4 (2-CO), 155.6 (CO-Z), 136.2 (C-Ph), 128.5, 128.2, 128.0 (CH-Ph), 71.7 (2-C), 66.9 ( $\text{CH}_2$ -Z), 46.7 ( $\alpha$ -C, Ala), 45.7 (4-C), 27.4 (3-C), 26.2 ( $\text{CH}_3$ -NH), 23.2 (2- $\text{CH}_3$ , Aza), 17.7 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 334.0  $[\text{M}+1]^+$ , 356.0  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$ : C, 61.25; H, 6.95; N, 12.60. Anal. Exp. (%): C, 61.00; H, 6.71; N, 12.74.



**Z-Ala-(S)-Azf-NH<sup>i</sup>Pr [(S)-44c]:** Sirupe. Rdto. 92 % [A partir de (S)-43c, Método C]. Gradiente de 25 a 33 % de AcOEt en hexano.  $[\alpha]_D^{25} = +20.1$  ( $c=0.47$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). HPLC:  $t_R = 7.47$  min (A:B=40:60).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.07 (d, 1H,  $J=7.7$ , NH-<sup>i</sup>Pr), 7.32-7.07 (m, 10H, Ph), 5.45 (d, 1H,  $J=7.0$ , NH-Ala), 5.07 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -Z), 4.04 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ala), 3.97 (m, 1H, CH-<sup>i</sup>Pr), 3.57 (m, 1H, H-4), 3.50 (d, 1H,  $J=13.9$ , 2- $\text{CH}_2$ , Azf), 3.12 (m, 1H, H-4), 2.90 (d, 1H,  $J=13.9$ , 2- $\text{CH}_2$ , Azf), 2.66 (m, 1H, H-3), 2.13 (ddd, 1H,  $J=12.0$ , 9.4, 4.9, H-3), 1.20 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.14 (d, 3H,  $J=6.6$ ,  $\text{CH}_3$ -<sup>i</sup>Pr), 1.08 (d, 3H,  $J=6.6$ ,  $\text{CH}_3$ -<sup>i</sup>Pr).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 7.99 (d, 1H,  $J=7.3$ , NH-<sup>i</sup>Pr), 7.67 (d, 1H,  $J=7.3$ , NH-Ala), 7.34-7.17 (m, 10H, Ph), 5.05 (d, 1H,  $J=12.6$ ,  $\text{CH}_2$ -Z), 5.01 (d, 1H,  $J=12.6$ ,  $\text{CH}_2$ -Z), 3.93 (q, 1H,  $J=7.3$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.81 (m, 1H, CH-<sup>i</sup>Pr), 3.75 (m, 1H, H-4), 3.31 (d, 1H,  $J=13.5$ , 2- $\text{CH}_2$ , Azf), 3.22 (m, 1H, H-4), 2.95 (d, 1H,  $J=13.5$ , 2- $\text{CH}_2$ , Azf), 2.28 (m, 1H, H-3), 1.99 (m, 1H, H-3), 1.12 (d, 3H,  $J=7.3$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.07 (d, 3H,  $J=6.2$ ,  $\text{CH}_3$ -<sup>i</sup>Pr), 1.04 (d, 3H,  $J=6.2$ ,  $\text{CH}_3$ -<sup>i</sup>Pr).  $^{13}\text{C}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.9 (CO-Ala), 172.3 (2-CO), 155.3 (CO-Z), 136.3, 134.4 (C-Ph), 130.3, 128.5, 128.4, 128.2, 128.0, 127.2 (CH-Ph), 75.6 (2-C), 66.8 ( $\text{CH}_2$ -Z), 46.6 ( $\alpha$ -C, Ala), 46.0 (4-C), 41.4 (CH-<sup>i</sup>Pr), 39.6 (2- $\text{CH}_2$ , Azf), 22.6 (3-C), 22.5 ( $\text{CH}_3$ -<sup>i</sup>Pr), 18.2 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 438.3  $[\text{M}+1]^+$ , 460.22  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4$ : C, 68.63; H, 7.14; N, 9.60. Anal. Exp. (%): C, 68.56; H, 7.27; N, 9.47.

### 1.7.7. Productos secundarios obtenidos en las reacciones de aminolisis.

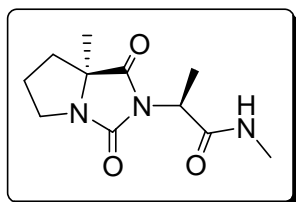


#### 1-(Metilcarbamoil)-(R,S)-Aza-Ala-NHMe [(R,S)-31b]:

Sirupe. Rdto. 58% [A partir de (R,S)-25b]. Eluyente:  $i$ PrOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:5). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Proporción de diastereoisómeros 1.2:1. Diastereoisómero mayoritario: Proporción de rotámeros 3.5:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  8.10 (m, 1H, NH-Ala), 6.61 (s a, 1H,

NH-CH<sub>3</sub>), 5.10 (s a, 1H, NH-CON), 4.36 (q, 1H,  $J$ =7.3,  $\alpha$ -H, Ala), 3.74 (m, 2H, H-4), 2.82 (d, 3H,  $J$ =4.7, CH<sub>3</sub>-NHCON), 2.78 (d, 3H,  $J$ =4.7, CH<sub>3</sub>-NH), 2.70 (m, 1H, H-3), 2.02 (m, 1H, H-3), 1.67 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.41 (d, 3H,  $J$ =7.3,  $\beta$ -H, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  8.10 (m, 1H, NH-Ala), 6.61 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 5.10 (s a, 1H, NH-CON), 4.28 (q, 1H,  $J$ =7.5,  $\alpha$ -H, Ala), 3.74 (m, 2H, H-4), 2.82 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-NHCON), 2.78 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-NH), 2.70 (m, 1H, H-3), 2.02 (m, 1H, H-3), 1.67 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.41 (m, 3H,  $\beta$ -H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Rotámero mayoritario:  $\delta$  174.5 (2-CO), 172.9 (CO-Ala), 159.3 (NCO), 69.5 (2-C), 48.9 ( $\alpha$ -C, Ala), 43.6 (4-C), 27.4 (3-C), 26.6 (CH<sub>3</sub>-NH o CH<sub>3</sub>-NHCON), 26.1 (CH<sub>3</sub>-NH o CH<sub>3</sub>-NHCON), 20.9 (2-CH<sub>3</sub>), 17.7 ( $\beta$ -C, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  175.4 (2-CO), 173.5 (CO-Ala), 157.8 (NCO), 70.2 (2-C), 49.3 ( $\alpha$ -C, Ala), 43.6 (4-C), 27.2 (3-C), 26.6 (CH<sub>3</sub>-NH o CH<sub>3</sub>-NHCON), 26.1 (CH<sub>3</sub>-NH o CH<sub>3</sub>-NHCON), 21.8 (2-CH<sub>3</sub>), 19.1 ( $\beta$ -C, Ala). Diastereoisómero minoritario: Proporción de rotámeros 3.5:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  8.42 (m, 1H, NH-Ala), 6.51 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 5.00 (s a, 1H, NH-CON), 4.36 (q, 1H,  $J$ =7.2,  $\alpha$ -H, Ala), 3.74 (m, 2H, H-4), 2.81 (d, 3H,  $J$ =4.5, CH<sub>3</sub>-NHCON), 2.79 (d, 3H,  $J$ =4.9, CH<sub>3</sub>-NH), 2.70 (m, 1H, H-3), 2.02 (m, 1H, H-3), 1.67 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.40 (d, 3H,  $J$ =7.2,  $\beta$ -H, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  8.42 (m, 1H, NH-Ala), 6.51 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 5.00 (s a, 1H, NH-CON), 4.28 (q, 1H,  $J$ =7.5,  $\alpha$ -H, Ala), 3.74 (m, 2H, H-4), 2.81 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-NHCON), 2.79 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-NH), 2.70 (m, 1H, H-3), 2.02 (m, 1H, H-3), 1.67 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.40 (m, 3H,  $\beta$ -H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Rotámero mayoritario:  $\delta$  175.0 (2-CO), 172.9 (CO-Ala), 159.2 (NCO), 69.7 (2-C), 48.9 ( $\alpha$ -C, Ala), 43.6 (4-C), 26.6 (3-C), 26.2 (CH<sub>3</sub>-NH o CH<sub>3</sub>-NHCON), 25.9 (CH<sub>3</sub>-NH o CH<sub>3</sub>-NHCON), 22.2 (2-CH<sub>3</sub>), 17.5 ( $\beta$ -C, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  175.4 (2-CO), 173.5 (CO-Ala), 157.8 (NCO), 70.2 (2-C), 49.3 ( $\alpha$ -C, Ala), 43.6 (4-C), 27.2 (3-C), 26.2 (CH<sub>3</sub>-NH o CH<sub>3</sub>-NHCON), 25.9 (CH<sub>3</sub>-NH o

CH<sub>3</sub>-NHCON), 22.3 (2-CH<sub>3</sub>), 18.7 (β-C, Ala). EM (ES modo positivo): 257.0 [M+1]<sup>+</sup>, 279.0 [M+Na]<sup>+</sup>, 535.1 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: C, 51.55; H, 7.87; N, 21.86. Anal. Exp. (%): C, 51.66; H, 7.58; N, 22.02.



**(S)-2-((S)-Tetrahydro-7a-metil-1,3-dioxo-1H-pirrololo[1,2-e]imidazol-2(3H)-il)-N-metilpropanamida (32):**

Sirupe. Rdto. 14% (A partir de **20b**). Eluyente: Acetona:AcOEt (1:5). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.02 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.57 (c, 1H, J=7.5, α-H, Ala), 3.69 (m,

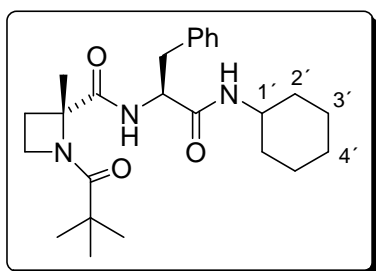
1H, δ-H, Pro), 3.21 (m, 1H, δ-H, Pro), 2.76 (d, 3H, J=4.7, CH<sub>3</sub>-NH), 2.05 (m, 2H, γ-H, Pro), 1.83 (m, 2H, β-H, Pro), 1.57 (d, 3H, J=7.5, β-H, Ala), 1.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-αPro). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 176.7 (CO-αPro), 169.6 (CO-Ala), 159.6 (CO-N), 68.7 (α-C, Pro), 50.5 (α-C, Ala), 44.7 (δ-C, Pro), 33.5 (β-C, Pro), 26.6 (CH<sub>3</sub>-NH), 25.9 (γ-C, Pro), 21.5 (CH<sub>3</sub>-αPro), 15.0 (β-C, Ala). EM (ES modo positivo): 240.1 [M+1]<sup>+</sup>, 501.2 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 55.22; H, 7.16; N, 17.56. Anal. Exp. (%): C, 55.45; H, 7.08; N, 17.46.

**1.7.8. Reacciones de N-acilación de derivados dipeptídicos.**

*Método A:* A una disolución del correspondiente dipéptido Z-protégido (0.73 mmol) en MeOH (15 mL) a 0 °C se añade Pd-C (15 % en peso) y se hidrogena a 15 psi y temperatura ambiente durante 1 h. Tras la filtración del catalizador, el disolvente se evapora a sequedad. A continuación se disuelve el crudo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (6 mL) y se enfría a 0 °C bajo atmósfera de argón. Seguidamente se adiciona TEA (0.21 mL, 1.53 mmol) y cloruro de acetilo o pivaloilo (1.17 mmol). Tras 2 h de reacción a temperatura ambiente el crudo de reacción se lava sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10 %, NaHCO<sub>3</sub> al 10 %, H<sub>2</sub>O y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a sequedad, purificando el residuo en columna de gel de sílice, con el sistema de eluyentes indicado en cada caso.

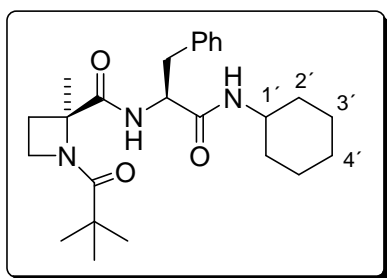
*Método B:* Siguiendo el mismo procedimiento que en el *Método A* excepto que, al ser el producto orgánico soluble en H<sub>2</sub>O, las fases acuosas se evaporan a sequedad y el residuo resultante se purifica con el sistema de eluyentes indicado en cada caso.

*Método C:* Consiste en el mismo procedimiento que el *Método A* excepto que la TEA se sustituye por óxido de propileno (0.77 mL, 10.92 mmol). Tras 15 h de reacción a temperatura ambiente se evapora el disolvente a sequedad, purificando el residuo en columna de gel de sílice en el sistema de eluyentes indicado en cada caso.



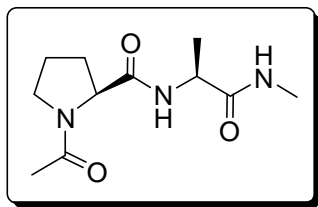
**Piv-(R)-Aza-Phe-NHChx [(R)-18b]:** Sirupe. Rdto. 18 % [A partir de **(R,S)-17b**, *Método A*]. Eluyente: Et<sub>2</sub>O. HPLC:  $t_R$  = 6.33 min. (A:B=40:60).  $[\alpha]_D^{25}$  = +21.78 ( $c$ =1.40, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.91 (d, 1H,  $J$ =8.4, NH-Phe), 7.33-7.17 (m, 5H, Ph), 6.13 (d, 1H,  $J$ =8.3, NH-Chx), 4.59 (c, 1H,  $J$ =8.4,  $\alpha$ -H, Phe), 4.23 (m, 2H, H-4), 3.72 (m,

1H, 1'-H), 3.14 (m, 2H,  $\beta$ -H, Phe), 2.74 (ddd, 1H,  $J$ =11.5, 9.3, 6.9, H-3), 1.95 (ddd, 1H,  $J$ =11.5, 8.9, 6.3, H-3), 1.78 (m, 2H, 2'-H), 1.63 (m, 2H, 4'-H), 1.54 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.30 (m, 2H, 3'-H), 1.17 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu), 1.10 (m, 2H, 3'-H), 0.99 (m, 2H, 2'-H). EM (ES modo positivo): 428.5 [M+1]<sup>+</sup>, 450.5 [M+Na]<sup>+</sup>, 877.9 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 70.22; H, 8.72; N, 9.83. Anal. Exp. (%): C, 70.31; H, 8.86; N, 9.69.

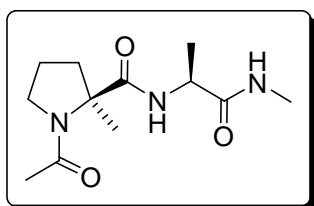


**Piv-(S)-Aza-Phe-NHChx [(S)-18b]:** Sirupe. Rdto. 18 % [A partir de **(R,S)-17b**, *Método A*]. Eluyente: Et<sub>2</sub>O. HPLC:  $t_R$  = 7.26 min. (A:B=40:60).  $[\alpha]_D^{25}$  = -86.12 ( $c$ =1.11, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.57 (d, 1H,  $J$ =8.5, NH-Phe), 7.29-7.17 (m, 5H, Ph), 6.41 (d, 1H,  $J$ =7.2, NH-Chx), 4.65 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Phe), 4.25 (m, 1H, H-4), 4.05 (ddd,

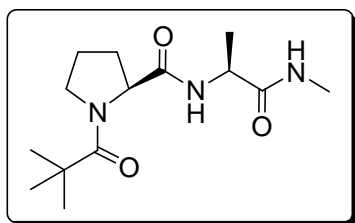
1H,  $J$ =9.7, 8.8, 5.3, H-4), 3.73 (m, 1H, 1'-H), 3.20 (dd, 1H,  $J$ =14.1, 7.3,  $\beta$ -H, Phe), 3.11 (dd, 1H,  $J$ =14.1, 5.8,  $\beta$ -H, Phe), 2.50 (ddd, 1H,  $J$ =11.7, 9.7, 6.8, H-3), 2.01 (ddd, 1H,  $J$ =11.7, 8.8, 6.1, H-3), 1.80 (m, 2H, 2'-H), 1.68 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.60 (m, 2H, 4'-H), 1.30 (m, 2H, 3'-H), 1.20-1.00 (m, 4H, 2'-H, 3'-H), 1.07 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu). EM (ES modo positivo): 428.5 [M+1]<sup>+</sup>, 450.5 [M+Na]<sup>+</sup>, 877.9 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 70.22; H, 8.72; N, 9.83. Anal. Exp. (%): C, 70.33; H, 8.83; N, 9.74.



**Ac-Pro-Ala-NHMe (22a):** Sirupe. Rdto. 11 % (A partir de **21a**, *Método A*). Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:10).  $[\alpha]_D = -60.71$  ( $c=0.54$ , CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Proporción de rotámeros 6:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  7.09 (d, 1H,  $J=7.1$ , NH-Ala), 6.53 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.48 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Pro), 4.37 (q, 1H,  $J=7.1$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.60 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 3.48 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.78 (d, 3H,  $J=4.8$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.28 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 2.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 2.03 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.36 (d, 3H,  $J=7.1$ , CH<sub>3</sub>-Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  6.75 (d, 1H,  $J=7.1$ , NH-Ala), 6.16 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.48 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Pro), 4.37 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ala), 3.60 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 3.48 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.78 (d, 3H,  $J=4.8$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.28 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 2.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 2.03 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.36 (d, 3H,  $J=7.1$ ,  $\beta$ -H, Ala). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Proporción de rotámeros 2.4:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  7.88 (d, 1H,  $J=7.5$ , NH-Ala), 7.56 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.22 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Pro), 4.15 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ala), 3.48 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.55 (d, 3H,  $J=4.6$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.03 (m, 2H,  $\beta$ -H, Pro), 1.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.83 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Pro), 1.18 (d, 3H,  $J=7.5$ ,  $\beta$ -H, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  8.16 (d, 1H,  $J=7.5$ , NH-Ala), 7.82 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.35 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Pro), 4.28 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ala), 3.48 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.55 (d, 3H,  $J=4.6$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.15 (m, 2H,  $\beta$ -H, Pro), 1.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.83 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Pro), 1.18 (d, 3H,  $J=7.5$ ,  $\beta$ -H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Rotámero mayoritario:  $\delta$  172.5 (CO-Ala), 171.33 (CO-CH<sub>3</sub>), 171.30 (CO-Pro), 60.2 ( $\alpha$ -C, Pro), 49.1 ( $\alpha$ -C, Ala), 48.5 ( $\delta$ -C, Pro), 28.1 ( $\beta$ -C, Pro), 26.3 (CH<sub>3</sub>-NH), 25.0 ( $\gamma$ -C, Pro), 22.6 (CH<sub>3</sub>-CO), 17.6 ( $\beta$ -C, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  172.5 (CO-Ala), 171.33 (CO-CH<sub>3</sub>), 171.30 (CO-Pro), 62.0 ( $\alpha$ -C, Pro), 49.1 ( $\alpha$ -C, Ala), 46.8 ( $\delta$ -C, Pro), 29.7 ( $\beta$ -C, Pro), 26.3 (CH<sub>3</sub>-NH), 25.0 ( $\gamma$ -C, Pro), 22.9 (CH<sub>3</sub>-CO), 18.4 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 242.1 [M+1]<sup>+</sup>, 264.0 [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 54.76; H, 7.94; N, 17.41. Anal. Exp. (%): C, 54.39; H, 8.08; N, 17.60.

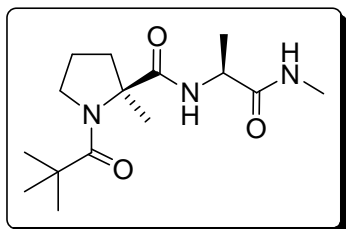


**Ac- $\alpha$ -MePro-Ala-NHMe (22b):** Sirupe. Rdto. 32 % (A partir de **21b**, *Método A*). Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:15).  $[\alpha]_D = -48.30$  ( $c=1.37$ , CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.04 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 6.44 (m, 1H, NH-Ala), 4.37 (q, 1H,  $J=7.5$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.65 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.77 (d, 3H,  $J=4.6$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.28 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 2.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 2.09-1.88 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>- $\alpha$ Pro), 1.39 (d, 3H,  $J=7.5$ ,  $\beta$ -H, Ala). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.76 (d, 1H,  $J=7.5$ , NH-Ala), 7.50 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.16 (q, 1H,  $J=7.5$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.67 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 3.57 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.54 (d, 3H,  $J=4.5$ , CH<sub>3</sub>-NH), 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.97-1.78 (m, 4H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>- $\alpha$ Pro), 1.22 (d, 3H,  $J=7.5$ ,  $\beta$ -H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  173.4 (CO- $\alpha$ Pro), 172.8 (CO-Ala), 170.5 (CO-CH<sub>3</sub>), 67.4 ( $\alpha$ -C, Pro), 49.4 ( $\delta$ -C, Pro), 49.2 ( $\alpha$ -C, Ala), 39.1 ( $\beta$ -C, Pro), 26.2 (CH<sub>3</sub>-NH), 23.8 (CH<sub>3</sub>-CO), 23.5 ( $\gamma$ -C, Pro), 21.1 (CH<sub>3</sub>- $\alpha$ Pro), 17.7 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 256.0 [M+1]<sup>+</sup>, 278.0 [M+Na]<sup>+</sup>, 533.3 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 56.45; H, 8.29; N, 16.46. Anal. Exp. (%): C, 56.26; H, 8.29; N, 16.53.



**Piv-Pro-Ala-NHMe (23a):** Sólido blanco. P.f. 85-87 °C. Rdto. 55 % (A partir de **21a**, *Método A*). Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:20).  $[\alpha]_D = -56.45$  ( $c=0.86$ , CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.90 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 6.67 (d, 1H,  $J=7.3$ , NH-Ala), 4.45 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Pro), 4.37 (q, 1H,  $J=7.3$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.71 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.71 (d, 3H,  $J=4.7$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.07-1.87 (m, 4H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.30 (d, 3H,  $J=7.3$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.24 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.72 (s a, 1H, NH-Ala), 7.64 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.30 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Pro), 4.13 (q, 1H,  $J=7.2$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.63 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.55 (d, 3H,  $J=4.6$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.07-1.87 (m, 4H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.22 (s a, 3H,  $\beta$ -H, Ala), 1.16 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  178.0 (CO-<sup>t</sup>Bu), 172.6 (CO-Ala), 172.0 (CO-Pro), 62.4 ( $\alpha$ -C, Pro), 48.7 ( $\alpha$ -C, Ala), 48.6 ( $\delta$ -C, Pro), 39.0 (C-<sup>t</sup>Bu), 27.6 ( $\beta$ -C, Pro), 27.4 (CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu), 26.1 (CH<sub>3</sub>-NH), 25.9 ( $\gamma$ -C, Pro), 17.9 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo):

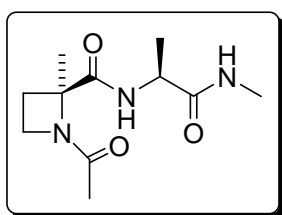
284.0  $[M+1]^+$ , 306.0  $[M+Na]^+$ , 589.3  $[2M+Na]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $C_{14}H_{25}N_3O_3$ : C, 59.34; H, 8.89; N, 14.83. Anal. Exp. (%): C, 59.56; H, 8.62; N, 14.77.



**Piv- $\alpha$ -MePro-Ala-NHMe (23b):** Sólido amorfo.

Rdto. 63 % (A partir de **21b**, Método A). Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:20).  $[\alpha]_D = -2.72$  (c=1, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.22 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 5.71 (d, 1H,  $J=7.5$ , NH-Ala), 4.45 (q, 1H,  $J=7.5$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.78 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.75 (d, 3H,  $J=4.7$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.06-1.80 (m, 4H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.56 (s, 3H, CH<sub>3</sub>- $\alpha$ Pro), 1.36 (d, 3H,  $J=7.5$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.26 (s, 9H, CH<sub>3</sub><sup>t</sup>Bu). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  7.46 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 7.28 (m, 1H,  $J=7.3$ , NH-Ala), 4.17 (q, 1H,  $J=7.3$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.86 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 3.75 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.54 (d, 3H,  $J=4.6$ , CH<sub>3</sub>-NH), 1.96 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Pro), 1.86 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.72 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>- $\alpha$ Pro), 1.21 (d, 3H,  $J=7.3$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.18 (s, 9H, CH<sub>3</sub><sup>t</sup>Bu). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  177.4 (CO-<sup>t</sup>Bu), 173.6 (CO- $\alpha$ Pro), 172.7 (CO-Ala), 69.0 ( $\alpha$ -C, Pro), 49.0 ( $\delta$ -C, Pro), 48.9 ( $\alpha$ -C, Ala), 39.4 (C-<sup>t</sup>Bu), 37.8 ( $\beta$ -C, Pro), 27.0 (CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu), 26.5 (CH<sub>3</sub>-NH), 24.8 ( $\gamma$ -C, Pro), 20.8 (CH<sub>3</sub>- $\alpha$ Pro), 17.9 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 298.0  $[M+1]^+$ , 320.0  $[M+Na]^+$ , 617.3  $[2M+Na]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $C_{15}H_{27}N_3O_3$ : C, 60.58; H, 9.15; N, 14.13. Anal. Exp. (%): C, 60.87; H, 9.03; N, 14.40.

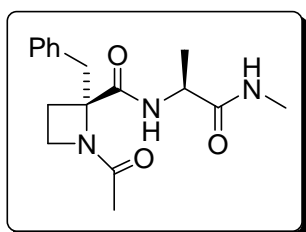


**Ac-(S)-Aza-Ala-NHMe [(S)-29b]:** Sirupe. Rdto. 21 % [A

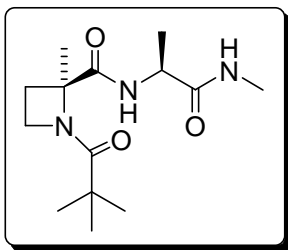
a partir de (S)-28b, Método A]. Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:20).  $[\alpha]_D = -127.74$  (c=1.01, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.51 (d, 1H,  $J=7.2$ , NH-Ala), 6.44 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.36 (q, 1H,  $J=7.2$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.98 (m, 2H, H-4), 2.78 (d, 3H,  $J=4.9$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.76 (m, 1H, H-3), 2.05 (m, 1H, H-3), 1.90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.73 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.37 (d, 3H,  $J=7.2$ ,  $\beta$ -H, Ala). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Proporción de rotámeros 3.3:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  8.35 (d, 1H,  $J=7.3$ , NH-Ala), 7.72 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.21 (q, 1H,  $J=7.3$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.05 (m, 1H, H-4), 3.93 (m, 1H, H-4), 2.56 (d, 3H,  $J=4.4$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.42 (m, 1H, H-3), 1.94 (m, 1H, H-3), 1.79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.54 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.19 (d, 3H,  $J=7.3$ ,  $\beta$ -H, Ala), Rotámero



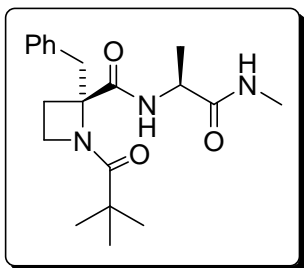
minoritario:  $\delta$  7.99 (d, 1H,  $J=7.5$ , NH-Ala), 7.82 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.21 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ala), 4.05 (m, 1H, H-4), 3.93 (m, 1H, H-4), 2.56 (d, 3H,  $J=4.4$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.42 (m, 1H, H-3), 1.94 (m, 1H, H-3), 1.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.62 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>), 1.21 (d, 3H,  $J=7.3$ ,  $\beta$ -H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  174.1 (2-CO), 172.5 (CO-Ala), 172.0 (CO-CH<sub>3</sub>), 71.1 (2-C), 49.1 ( $\alpha$ -C, Ala), 45.9 (4-C), 26.4 (3-C), 26.3 (CH<sub>3</sub>-NH), 23.0 (2-CH<sub>3</sub>), 19.7 (CH<sub>3</sub>-CO), 17.1 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 242.1 [M+1]<sup>+</sup>, 264.0 [M+Na]<sup>+</sup>, 505.2 [2M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 54.76; H, 7.94; N, 17.41. Anal. Exp. (%): C, 54.89; H, 7.91; N, 17.25.



**Ac-(S)-Azf-Ala-NHMe [(S)-29c]:** Sirupe. Rdto. 23 % [A partir de (S)-28c, Método A]. Eluyente: Acetona:AcOEt (1:2). HPLC:  $t_R$  = 4.64 min. (A:B=20:80).  $[\alpha]_D^{25}$  = -5.62 ( $c=0.64$ , CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.78 (d, 1H,  $J=7.1$ , NH-Ala), 7.28-7.14 (m, 5H, Ph), 6.37 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.33 (q, 1H,  $J=7.1$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.56 (m, 1H, H-4), 3.53 (d, 1H,  $J=13.8$ , 2-CH<sub>2</sub>), 2.95 (d, 1H,  $J=13.8$ , 2-CH<sub>2</sub>), 2.92 (m, 1H, H-4), 2.72 (d, 3H,  $J=4.9$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.60 (m, 1H, H-3), 2.16 (m, 1H, H-3), 1.77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.35 (d, 3H,  $J=7.1$ ,  $\beta$ -H, Ala). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8.67 (d, 1H,  $J=7.3$ , NH-Ala), 7.78 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 7.35-7.19 (m, 5H, Ph), 4.26 (q, 1H,  $J=7.3$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.69 (m, 1H, H-4), 3.37 (d, 1H,  $J=13.4$ , 2-CH<sub>2</sub>), 2.99 (d, 1H,  $J=13.4$ , 2-CH<sub>2</sub>), 2.91 (m, 1H, H-4), 2.60 (d, 3H,  $J=4.6$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.34 (m, 1H, H-3), 2.04 (m, 1H, H-3), 1.74 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.22 (d, 3H,  $J=7.3$ ,  $\beta$ -H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  173.7, 172.6, 172.5 (CO-Ala, 2-CO, CO-CH<sub>3</sub>), 134.7 (C-Ph), 130.4, 130.3, 128.4 (CH-Ph), 74.8 (2-C), 49.3 ( $\alpha$ -C, Ala), 46.2 (4-C), 39.3 (2-CH<sub>2</sub>), 26.3 (CH<sub>3</sub>-NH), 22.4 (3-C), 19.7 (CH<sub>3</sub>-CO), 17.1 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 318.0 [M+1]<sup>+</sup>, 240.0 [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 64.33; H, 7.30; N, 13.24. Anal. Exp. (%): C, 64.26; H, 7.42; N, 13.36.

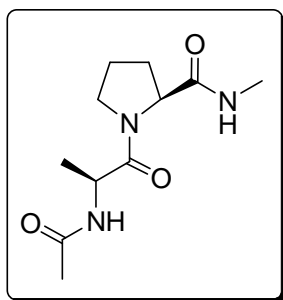


**Piv-(S)-Aza-Ala-NHMe [(S)-30b]:** Sirupe. Rdto. 63 % [A partir de (S)-28b, Método A]. Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:30).  $[\alpha]_D = -150.68$  (c=0.52, CHCl<sub>3</sub>). Los datos espectroscópicos son idénticos al diastereoisómero mayoritario de (R,S)-30b.

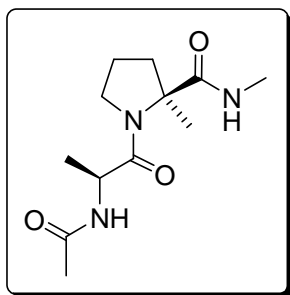


**Piv-(S)-Azf-Ala-NHMe [(S)-30c]:** Sirupe. Rdto. 90 % [A partir de (S)-28c, Método A]. Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:30). HPLC:  $t_R = 3.77$  min. (A:B=40:60).  $[\alpha]_D = -5.17$  (c=0.97, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.55 (d, 1H,  $J=7.2$ , NH-Ala), 7.35-7.20 (m, 5H, Ph), 6.49 (s, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.41 (q, 1H,  $J=7.2$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.95 (ddd, 1H,  $J=9.8, 8.3, 5.3$ , H-4), 3.68 (d, 1H,  $J=13.9$ , 2-CH<sub>2</sub>), 3.38

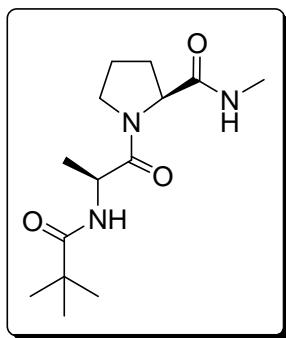
(m, 1H, H-4), 3.04 (d, 1H,  $J=13.9$ , 2-CH<sub>2</sub>), 2.77 (d, 3H,  $J=4.9$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.66 (ddd, 1H,  $J=12.1, 9.8, 7.2$ , H-3), 2.26 (ddd, 1H,  $J=12.1, 9.4, 5.3$ , H-3), 1.39 (d, 3H,  $J=7.2$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.13 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8.35 (d, 1H,  $J=7.2$ , NH-Ala), 7.78 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 7.34-7.20 (m, 5H, Ph), 4.27 (q, 1H,  $J=7.2$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.04 (m, 1H, H-4), 3.46 (d, 1H,  $J=13.3$ , 2-CH<sub>2</sub>), 3.24 (m, 1H, H-4), 2.97 (d, 1H,  $J=13.3$ , 2-CH<sub>2</sub>), 2.60 (d, 3H,  $J=4.7$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.34 (m, 1H, H-3), 2.10 (m, 1H, H-3), 1.23 (d, 3H,  $J=7.2$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.06 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  179.7 (CO-<sup>t</sup>Bu), 173.9 (2-CO), 172.5 (CO-Ala), 135.1 (C-Ph), 130.6, 130.0, 128.3 (CH-Ph), 75.5 (2-C), 49.6 (4-C), 49.1 ( $\alpha$ -C, Ala), 39.1 (C-<sup>t</sup>Bu), 38.7 (2-CH<sub>2</sub>), 26.9 (CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu), 26.3 (CH<sub>3</sub>-NH), 23.5 (3-C), 17.2 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 382.0 [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 66.83; H, 8.13; N, 11.69. Anal. Exp. (%): C, 66.76; H, 8.01; N, 11.59.



**Ac-Ala-Pro-NHMe (37a):** Sólido. P.f. 173-175 °C. Rdto. 88 % (A partir de **36a**, *Método C*). Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:30).  $[\alpha]_D = -146.9$  (c=0.99, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Proporción de rotámeros 4:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  6.61 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 6.37 (m, 1H, NH-Ala), 4.74 (q, 1H,  $J=6.9$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.51 (dd, 1H,  $J=8.1$ , 3.0,  $\alpha$ -H, Pro), 3.66 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 3.53 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.78 (d, 3H,  $J=4.7$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.37 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 2.20-1.82 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.35 (d, 3H,  $J=6.9$ ,  $\beta$ -H, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  7.46 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 6.11 (m, 1H, NH-Ala), 4.28 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Pro), 4.23 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ala), 3.66 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 3.53 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.84 (d, 3H,  $J=4.7$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.54 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 2.20-1.82 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.31 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Proporción de rotámeros 3.5:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  8.11 (d, 1H,  $J=7.2$ , NH-Ala), 7.69 (c, 1H,  $J=4.6$ , NH-CH<sub>3</sub>), 4.51 (q, 1H,  $J=7.2$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.20 (dd, 1H,  $J=8.4$ , 4.0,  $\alpha$ -H, Pro), 3.55 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.55 (d, 3H,  $J=4.6$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.07-1.71 (m, 4H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.16 (d, 3H,  $J=7.2$ ,  $\beta$ -H, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  8.06 (d, 1H,  $J=7.0$ , NH-Ala), 7.98 (c, 1H,  $J=4.7$ , NH-CH<sub>3</sub>), 4.31 (dd, 1H,  $J=7.3$ , 3.3,  $\alpha$ -H, Pro), 4.26 (q, 1H,  $J=7.0$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.55 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.58 (d, 3H,  $J=4.7$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.07-1.71 (m, 4H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.13 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Rotámero mayoritario:  $\delta$  172.6 (CO-Ala), 171.4 (CO-Pro), 169.4 (CO-CH<sub>3</sub>), 59.8 ( $\alpha$ -C, Pro), 47.2 ( $\delta$ -C, Pro), 46.6 ( $\alpha$ -C, Ala), 27.4 ( $\beta$ -C, Pro), 26.2 (CH<sub>3</sub>-NH), 25.0 ( $\gamma$ -C, Pro), 23.0 (CH<sub>3</sub>-CO), 18.1 ( $\beta$ -C, Ala). Rotámero minoritario:  $\delta$  171.9 (CO-Ala), 171.1 (CO-CH<sub>3</sub>), 170.9 (CO-Pro), 60.9 ( $\alpha$ -C, Pro), 48.1 ( $\alpha$ -C, Ala), 46.8 ( $\delta$ -C, Pro), 31.4 ( $\beta$ -C, Pro), 26.5 (CH<sub>3</sub>-NH), 22.5 (CH<sub>3</sub>-CO), 21.9 ( $\gamma$ -C, Pro), 16.4 ( $\beta$ -C, Ala). MS (ES modo positivo): 264.0 [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 54.76; H, 7.94; N, 17.41. Anal. Exp. (%): C, 54.55; H, 8.12; N, 17.37.

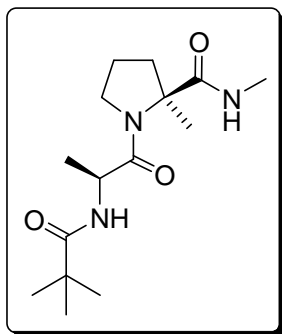


**Ac-Ala- $\alpha$ -MePro-NHMe (37b):** Aceite. Rdto. 7 % (A partir de **36b**, *Método A*). Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:10).  $[\alpha]_D = -91.8$  (c=0.46, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.54 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 6.49 (d, 1H,  $J=7.1$ , NH-Ala), 4.70 (q, 1H,  $J=7.1$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.75 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 3.60 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.79 (d, 3H,  $J=4.8$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.50 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 2.20 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Pro), 1.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.95 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Pro), 1.73 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.63 (s, 3H,  $\alpha$ -CH<sub>3</sub>, Pro), 1.33 (d, 3H,  $J=7.1$ ,  $\beta$ -H, Ala). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8.08 (d, 1H,  $J=7.3$ , NH-Ala), 7.31 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.50 (q, 1H,  $J=7.3$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.59 (t, 2H,  $J=6.0$ ,  $\delta$ -H, Pro), 2.51 (d, 3H,  $J=4.4$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.14 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.94-1.68 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.39 (s, 3H,  $\alpha$ -CH<sub>3</sub>, Pro), 1.11 (d, 3H,  $J=7.3$ ,  $\beta$ -H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  174.0 (CO-Pro), 171.9 (CO-Ala), 169.4 (CO-CH<sub>3</sub>), 68.4 ( $\alpha$ -C, Pro), 48.8 ( $\delta$ -C, Pro), 47.2 ( $\alpha$ -C, Ala), 38.4 ( $\beta$ -C, Pro), 26.6 (CH<sub>3</sub>-NH), 23.5 ( $\gamma$ -C, Pro), 23.2 (CH<sub>3</sub>-CO), 22.2 ( $\alpha$ -CH<sub>3</sub>, Pro), 17.9 ( $\beta$ -C, Ala). MS (ES modo positivo): 256.0 [M+1]<sup>+</sup>, 278.1 [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 56.45; H, 8.29; N, 16.46. Anal. Exp. (%): C, 56.59; H, 8.07; N, 16.31.



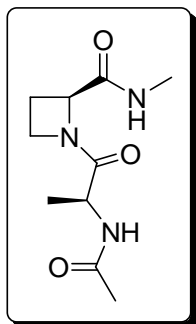
**Piv-Ala-Pro-NHMe (38a):** Sólido. P.f. 140-142 °C. Rdto. 35 % (A partir de **36a**, *Método A*). Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:20).  $[\alpha]_D = -100.0$  (c=0.60, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Proporción de rotámeros 6:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  6.62 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 6.52 (d, 1H,  $J=7.0$ , NH-Ala), 4.70 (q, 1H,  $J=7.0$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.52 (dd, 1H,  $J=8.1, 2.8$ ,  $\alpha$ -H, Pro), 3.68 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 3.53 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.79 (d, 3H,  $J=4.8$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.36 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 2.23-1.84 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.34 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.20 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu), Rotámero minoritario:  $\delta$  7.69 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 5.98 (d, 1H,  $J=6.9$ , NH-Ala), 4.28 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Pro), 4.17 (q, 1H,  $J=6.9$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.68 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 3.53 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.83 (d, 3H,  $J=4.7$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.55 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 2.23-1.84 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.31 (d, 3H,  $J=6.9$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.20 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu).

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): Proporción de rotámeros 4:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  7.70 (c, 1H,  $J=4.8$ , NH-CH $_3$ ), 7.46 (d, 1H,  $J=7.0$ , NH-Ala), 4.49 (q, 1H,  $J=7.0$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.20 (dd, 1H,  $J=8.2$ , 4.2,  $\alpha$ -H, Pro), 3.51 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.54 (d, 3H,  $J=4.7$ , CH $_3$ -NH), 2.02 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.95-1.66 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.19 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.08 (s, 9H, CH $_3$ - $^1\text{Bu}$ ), Rotámero minoritario:  $\delta$  8.03 (c, 1H,  $J=4.8$ , NH-CH $_3$ ), 7.27 (d, 1H,  $J=7.1$ , NH-Ala), 4.49 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ala), 4.27 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Pro), 3.51 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.59 (d, 3H,  $J=4.7$ , CH $_3$ -NH), 2.02 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.95-1.66 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.19 (m, 3H,  $\beta$ -H, Ala), 1.08 (s, 9H, CH $_3$ - $^1\text{Bu}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz, CDCl $_3$ ): Rotámero mayoritario:  $\delta$  177.9 (CO- $^1\text{Bu}$ ), 173.0 (CO-Ala), 171.4 (CO-Pro), 59.9 ( $\alpha$ -C, Pro), 47.2 ( $\delta$ -C, Pro), 46.6 ( $\alpha$ -C, Ala), 38.5 (C- $^1\text{Bu}$ ), 27.4 (CH $_3$ - $^1\text{Bu}$ ), 27.1 ( $\beta$ -C, Pro), 26.2 (CH $_3$ -NH), 25.1 ( $\gamma$ -C, Pro), 18.2 ( $\beta$ -C, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  177.9 (CO- $^1\text{Bu}$ ), 173.0 (CO-Ala), 171.4 (CO-Pro), 59.9 ( $\alpha$ -C, Pro), 46.9 ( $\delta$ -C, Pro), 46.6 ( $\alpha$ -C, Ala), 38.3 (C- $^1\text{Bu}$ ), 31.5 ( $\beta$ -C, Pro), 26.7 (CH $_3$ - $^1\text{Bu}$ ), 26.6 (CH $_3$ -NH), 22.1 ( $\gamma$ -C, Pro), 16.7 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 284.2  $[\text{M}+1]^+$ , 306.3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Anal. (%) Calc. para C $_{14}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$ : C, 59.34; H, 8.89; N, 14.83. Anal. Exp. (%): C, 59.11; H, 8.63; N, 14.60.

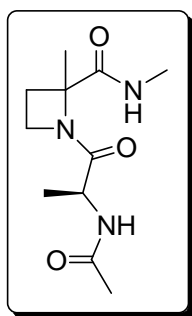


**Piv-Ala- $\alpha$ -MePro-NHMe (38b):** Sirupe. Rdto. 66 % (A partir de **36b**, Método A). Eluyente: MeOH:CH $_2$ Cl $_2$  (1:20),  $[\alpha]_D = -102.7$  ( $c=1.76$ , CHCl $_3$ ).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, CDCl $_3$ ):  $\delta$  6.68 (s a, 1H, NH-CH $_3$ ), 6.54 (d, 1H,  $J=7.0$ , NH-Ala), 4.66 (q, 1H,  $J=7.0$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.74 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 3.57 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.79 (d, 3H,  $J=4.7$ , CH $_3$ -NH), 2.51 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.96 (q, 2H,  $J=7.0$ ,  $\gamma$ -H, Pro), 1.73 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.63 (s, 3H,  $\alpha$ -CH $_3$ , Pro), 1.32 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.18 (s, 9H, CH $_3$ - $^1\text{Bu}$ ).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.42 (d, 1H,  $J=7.2$ , NH-Ala), 7.28 (m, 1H, NH-CH $_3$ ), 4.52 (q, 1H,  $J=7.2$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.55 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.52 (d, 3H,  $J=4.6$ , CH $_3$ -NH), 1.92 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.82 (q, 2H,  $J=6.6$ ,  $\gamma$ -H, Pro), 1.70 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.40 (s, 3H,  $\alpha$ -CH $_3$ , Pro), 1.14 (d, 3H,  $J=7.2$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.07 (s, 9H, CH $_3$ - $^1\text{Bu}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz, CDCl $_3$ ):  $\delta$  177.7 (CO- $^1\text{Bu}$ ), 174.0 (CO-Pro), 172.1 (CO-Ala), 68.3 ( $\alpha$ -C, Pro), 48.4 ( $\delta$ -C, Pro), 47.0 ( $\alpha$ -C, Ala), 38.5 (C- $^1\text{Bu}$ ), 38.4 ( $\beta$ -C, Pro), 27.3 (CH $_3$ - $^1\text{Bu}$ ), 26.5 (CH $_3$ -NH), 23.5 ( $\gamma$ -C, Pro), 22.2 ( $\alpha$ -CH $_3$ , Pro), 17.8 ( $\beta$ -C, Ala).

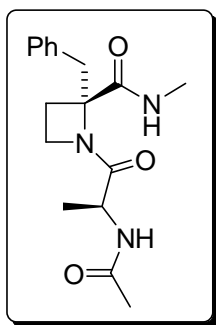
EM (ES modo positivo): 298.3  $[M+1]^+$ , 320.2  $[M+Na]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $C_{15}H_{27}N_3O_3$ : C, 60.58; H, 9.15; N, 14.13. Anal. Exp. (%): C, 60.70; H, 9.01; N, 14.21.



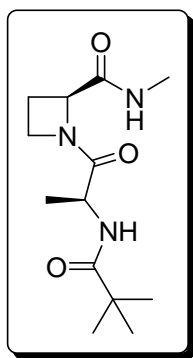
**Ac-Ala-Azg-NHMe (41a):** Sirupe. Rdto. 80 % (A partir de **40a**, Método B). Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:20).  $[\alpha]_D = -158.1$  ( $c=1.13$ , CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Proporción de rotámeros 3.5:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  7.31 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 6.30 (m, 1H, NH-Ala), 4.84 (dd, 1H,  $J=9.4, 6.2$ , H-2), 4.50 (q, 1H,  $J=7.0$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.31 (m, 1H, H-4), 4.08 (m, 1H, H-4), 2.80 (d, 3H,  $J=4.7$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.70 (m, 1H, H-3), 2.47 (m, 1H, H-3), 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.30 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  8.21 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 6.49 (m, 1H, NH-Ala), 4.75 (dd, 1H,  $J=10.2, 5.3$ , H-2), 4.01 (m, 3H, H-4,  $\alpha$ -H, Ala), 2.89 (d, 3H,  $J=4.7$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.70 (m, 1H, H-3), 2.34 (m, 1H, H-3), 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.30 (m, 3H,  $\beta$ -H, Ala). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Proporción de rotámeros 2.7:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  8.17 (d, 1H,  $J=6.8$ , NH-Ala), 7.86 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.59 (dd, 1H,  $J=8.8, 5.9$ , H-2), 4.32 (q, 1H,  $J=6.8$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.27 (m, 1H, H-4), 4.17 (m, 1H, H-4), 2.69 (d, 3H,  $J=4.9$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.49 (m, 1H, H-3), 2.16 (m, 1H, H-3), 1.90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.24 (d, 3H,  $J=6.8$ ,  $\beta$ -H, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  8.37 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 8.17 (m, 1H, NH-Ala), 4.85 (dd, 1H,  $J=8.8, 3.9$ , H-2), 4.13 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ala), 3.87 (m, 2H, H-4), 2.74 (d, 3H,  $J=3.9$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.64 (m, 1H, H-3), 2.16 (m, 1H, H-3), 1.90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.24 (m, 3H,  $\beta$ -H, Ala). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Rotámero mayoritario:  $\delta$  174.5 (CO-Ala), 170.9 (2-CO), 169.7 (CO-CH<sub>3</sub>), 61.9 (2-C), 48.8 (4-C), 44.4 ( $\alpha$ -C, Ala), 26.1 (CH<sub>3</sub>-NH), 22.8 (CH<sub>3</sub>-CO), 18.8 (3-C), 17.9 ( $\beta$ -C, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  173.1 (CO-Ala), 171.5 (CO-CH<sub>3</sub>), 170.6 (2-CO), 63.0 (2-C), 46.3 (4-C), 46.1 ( $\alpha$ -C, Ala), 26.2 (CH<sub>3</sub>-NH), 22.3 (CH<sub>3</sub>-CO), 22.2 (3-C), 16.1 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 228.1  $[M+1]$ , 250.1  $[M+Na]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $C_{10}H_{17}N_3O_3$ : C, 52.85; H, 7.54; N, 18.49. Anal. Exp. (%): C, 52.71; H, 7.63; N, 18.29.



**Ac-Ala-(*R,S*)-Aza-NHMe [(*R,S*)-41b]:** Sólido. Rdto. 52 % [A partir de (*R,S*)-40b, Método C]. Eluyente: Acetona:AcOEt (1:1). HPLC:  $t_R$  = 21.38 min (CHIRAL-PAK). Proporción de diastereoisómeros 1.1:1.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Diastereoisómero mayoritario:  $\delta$  7.83 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 6.42 (d, 1H,  $J$ =7.0, NH-Ala), 4.41 (q, 1H,  $J$ =7.0,  $\alpha$ -H, Ala), 4.23 (m, 1H, H-4), 3.90 (m, 1H, H-4), 2.79 (m, 1H, H-3), 2.77 (d, 3H,  $J$ =4.5, CH<sub>3</sub>-NH), 2.10 (m, 1H, H-3), 1.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.70 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>, Aza), 1.26 (d, 3H,  $J$ =7.0,  $\beta$ -H, Ala), Diastereoisómero minoritario:  $\delta$  7.83 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 6.48 (d, 1H,  $J$ =7.0, NH-Ala), 4.32 (q, 1H,  $J$ =7.0,  $\alpha$ -H, Ala), 4.13 (m, 1H, H-4), 4.00 (m, 1H, H-4), 2.79 (m, 1H, H-3), 2.77 (d, 3H,  $J$ =4.5, CH<sub>3</sub>-NH), 2.10 (m, 1H, H-3), 1.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.69 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>, Aza), 1.29 (d, 3H,  $J$ =7.0,  $\beta$ -H, Ala).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ): Diastereoisómero mayoritario:  $\delta$  8.16 (d, 1H,  $J$ =6.9, NH-Ala), 7.78 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.15 (m, 2H, H-4,  $\alpha$ -H, Ala), 3.98 (m, 1H, H-4), 2.62 (d, 3H,  $J$ =3.9, CH<sub>3</sub>-NH), 2.31 (m, 1H, H-3), 2.09 (m, 1H, H-3), 1.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.54 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>, Aza), 1.15 (d, 3H,  $J$ =6.9,  $\beta$ -H, Ala), Diastereoisómero minoritario:  $\delta$  8.24 (d, 1H,  $J$ =6.9, NH-Ala), 7.78 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 4.07 (m, 2H, H-4,  $\alpha$ -H, Ala), 3.98 (m, 1H, H-4), 2.61 (d, 3H,  $J$ =3.9, CH<sub>3</sub>-NH), 2.31 (m, 1H, H-3), 2.00 (m, 1H, H-3), 1.84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.54 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>, Aza), 1.15 (d, 3H,  $J$ =6.9,  $\beta$ -H, Ala).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Diastereoisómero mayoritario:  $\delta$  174.4 (2-CO), 173.6 (CO-Ala), 169.6 (CO-CH<sub>3</sub>), 72.0 (2-C), 45.8 (4-C), 44.9 ( $\alpha$ -C, Ala), 26.9 (3-C), 26.1 (CH<sub>3</sub>-NH), 23.4 (2-CH<sub>3</sub>, Aza), 23.0 (CH<sub>3</sub>-CO), 17.9 ( $\beta$ -C, Ala), Diastereoisómero minoritario:  $\delta$  173.8 (2-CO), 172.6 (CO-Ala), 169.9 (CO-CH<sub>3</sub>), 71.5 (2-C), 45.8 (4-C), 45.2 ( $\alpha$ -C, Ala), 27.6 (3-C), 26.2 (CH<sub>3</sub>-NH), 23.0 (CH<sub>3</sub>-CO), 22.9 (2-CH<sub>3</sub>, Aza), 17.3 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 242.0  $[\text{M}+1]^+$ , 264.0  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ : C, 54.76; H, 7.94; N, 17.41. Anal. Exp. (%): C, 54.70; H, 7.99; N, 17.30.



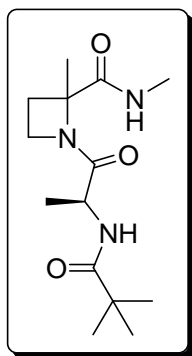
**Ac-Ala-(S)-Azf-NHMe [(S)-41c]:** Sirupe. Rdto. 60 % [A partir de (S)-40c, Método C]. Eluyente: Acetona:AcOEt (1:2). HPLC:  $t_R = 3.25$  min (A:B=20:80).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.14 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 7.24 (m, 5H, Ph), 7.22 (d, 1H,  $J=6.9$ , NH-Ala), 4.35 (q, 1H,  $J=6.9$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.63 (ddd, 1H,  $J=9.8$ , 8.5, 4.9, H-4), 3.56 (d, 1H,  $J=13.9$ , 2-CH<sub>2</sub>, Azf), 3.17 (m, 1H, H-4), 2.97 (d, 1H,  $J=13.9$ , 2-CH<sub>2</sub>, Azf), 2.86 (d, 3H,  $J=4.7$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.73 (ddd, 1H,  $J=12.2$ , 9.8, 7.2, H-3), 2.23 (ddd, 1H,  $J=12.2$ , 9.2, 4.9, H-3), 2.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.26 (d, 3H,  $J=6.9$ ,  $\beta$ -H, Ala).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  8.18 (d, 1H,  $J=7.3$ , NH-Ala), 8.04 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 7.25 (m, 5H, Ph), 4.19 (q, 1H,  $J=7.3$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.78 (m, 1H, H-4), 3.37 (d, 1H,  $J=13.8$ , 2-CH<sub>2</sub>, Azf), 3.19 (m, 1H, H-4), 2.98 (d, 1H,  $J=13.8$ , 2-CH<sub>2</sub>, Azf), 2.67 (d, 3H,  $J=4.6$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.23 (m, 1H, H-3), 2.00 (m, 1H, H-3), 1.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.14 (d, 3H,  $J=7.3$ ,  $\beta$ -H, Ala).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  174.1 (2-CO), 173.9 (CO-Ala), 169.0 (CO-CH<sub>3</sub>), 134.6 (C-Ph), 130.3, 128.5, 127.4 (CH-Ph), 75.7 (2-C), 46.1 (4-C), 45.0 ( $\alpha$ -C, Ala), 39.6 (2-CH<sub>2</sub>, Azf), 26.3 (CH<sub>3</sub>-NH), 23.3 (CH<sub>3</sub>-CO), 22.8 (3-C), 18.1 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 318.3  $[\text{M}+1]^+$ , 340.3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3$ : C, 64.33; H, 7.30; N, 13.24. Anal. Exp. (%): C, 64.52; H, 7.22; N, 13.33.



**Piv-Ala-Azg-NHMe (42a):** Sirupe. Rdto. 5 % (A partir de 40a, Método A). Eluyente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:50).  $[\alpha]_D = -72.4$  ( $c=0.21$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Proporción de rotámeros 7.4:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  7.29 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 6.22 (m, 1H, NH-Ala), 4.81 (dd, 1H,  $J=9.6$ , 6.2, H-2), 4.40 (q, 1H,  $J=7.0$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.24 (m, 1H, H-4), 4.01 (m, 1H, H-4), 2.75 (d, 3H,  $J=4.7$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.69 (m, 1H, H-3), 2.43 (m, 1H, H-3), 1.24 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.14 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>1</sup>Bu), Rotámero minoritario:  $\delta$  7.29 (s a, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 6.22 (m, 1H, NH-Ala), 4.81 (m, 1H, H-2), 4.40 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ala), 4.24 (m, 1H, H-4), 4.01 (m, 1H, H-4), 2.83 (d, 3H,  $J=4.7$ , CH<sub>3</sub>-NH), 2.69 (m, 1H, H-3), 2.43 (m, 1H, H-3), 1.29 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.13 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>1</sup>Bu).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): Proporción de rotámeros 4.2:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  7.84 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 7.50 (d, 1H,  $J=7.0$ , NH-Ala), 4.50 (dd, 1H,  $J=9.0$ , 5.6, H-2), 4.22 (q, 1H,

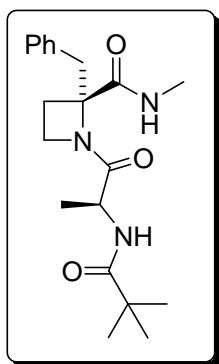


$J=7.0$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.08 (m, 1H, H-4), 3.80 (m, 1H, H-4), 2.60 (d, 3H,  $J=4.6$ ,  $\text{CH}_3\text{-NH}$ ), 2.42 (m, 1H, H-3), 2.10 (m, 1H, H-3), 1.18 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.08 (s, 9H,  $\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$ ), Rotámero minoritario:  $\delta$  7.71 (m, 1H,  $\text{NH-CH}_3$ ), 7.31 (d, 1H,  $J=7.8$ ,  $\text{NH-Ala}$ ), 4.80 (m, 1H, H-2), 4.22 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ala), 4.08 (m, 2H, H-4), 2.57 (d, 3H,  $J=4.6$ ,  $\text{CH}_3\text{-NH}$ ), 2.42 (m, 1H, H-3), 2.10 (m, 1H, H-3), 1.18 (m, 3H,  $\beta$ -H, Ala), 1.09 (s, 9H,  $\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Rotámero mayoritario:  $\delta$  178.2 ( $\text{CO-}^t\text{Bu}$ ), 175.0 ( $\text{CO-Ala}$ ), 171.0 (2-CO), 62.1 (2-C), 48.8 (4-C), 44.6 ( $\alpha$ -C, Ala), 38.6 ( $\text{C-}^t\text{Bu}$ ), 27.4 ( $\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$ ), 26.2 ( $\text{CH}_3\text{-NH}$ ), 18.8 (3-C), 18.1 ( $\beta$ -C, Ala), Rotámero minoritario:  $\delta$  178.2 ( $\text{CO-}^t\text{Bu}$ ), 175.0 ( $\text{CO-Ala}$ ), 171.0 (2-CO), 62.8 (2-C), 48.7 (4-C), 44.6 ( $\alpha$ -C, Ala), 38.6 ( $\text{C-}^t\text{Bu}$ ), 29.7 ( $\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$ ), 26.2 ( $\text{CH}_3\text{-NH}$ ), 18.8 (3-C), 18.1 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 292.0  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3$ : C, 57.97; H, 8.61; N, 15.60. Anal. Exp. (%): C, 58.10; H, 8.39; N, 15.53.



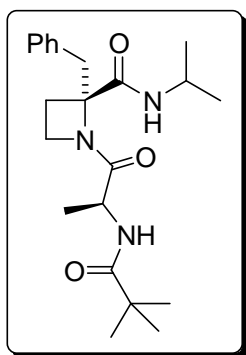
**Piv-Ala-(*R,S*)-Aza-NHMe [(*R,S*)-42b]:** Sólido. Rdto. 66 % [A partir de (*R,S*)-40b, Método A]. Eluyente: Acetona:AcOEt (1:3). HPLC:  $t_R = 6.14$  min (Diastereoisómero mayoritario, CHIRAL-PAK) y 13.76 min (Diastereoisómero minoritario, CHIRAL-PAK). Proporción de diastereoisómeros 1.1:1.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Diastereoisómero mayoritario:  $\delta$  7.86 (s a, 1H,  $\text{NH-CH}_3$ ), 6.32 (m, 1H,  $\text{NH-Ala}$ ), 4.41 (q, 1H,  $J=7.0$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.20 (m, 1H, H-4), 3.97 (m, 1H, H-4), 2.82 (m, 1H, H-3), 2.80 (d, 3H,  $J=4.9$ ,  $\text{CH}_3\text{-NH}$ ), 2.13 (m, 1H, H-3), 1.73 (s, 3H, 2- $\text{CH}_3$ , Aza), 1.28 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.21 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$ ), Diastereoisómero minoritario:  $\delta$  7.86 (s a, 1H,  $\text{NH-CH}_3$ ), 6.25 (m, 1H,  $\text{NH-Ala}$ ), 4.30 (q, 1H,  $J=7.0$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.20 (m, 1H, H-4), 3.97 (m, 1H, H-4), 2.82 (m, 1H, H-3), 2.80 (d, 3H,  $J=4.9$ ,  $\text{CH}_3\text{-NH}$ ), 2.13 (m, 1H, H-3), 1.72 (s, 3H, 2- $\text{CH}_3$ , Aza), 1.32 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.20 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$ ).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): Diastereoisómero mayoritario:  $\delta$  7.82 (m, 1H,  $\text{NH-CH}_3$ ), 7.55 (d, 1H,  $J=7.0$ ,  $\text{NH-Ala}$ ), 4.13 (m, 1H, H-4), 4.06 (q, 1H,  $J=7.8$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.95 (m, 1H, H-4), 2.62 (d, 3H,  $J=3.9$ ,  $\text{CH}_3\text{-NH}$ ), 2.35 (m, 1H, H-3), 2.00 (m, 1H, H-3), 1.54 (s, 3H, 2- $\text{CH}_3$ , Aza), 1.17 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.09 (s, 9H,  $\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$ ), Diastereoisómero minoritario:  $\delta$  7.73 (m, 2H,  $\text{NH-CH}_3$ ,  $\text{NH-Ala}$ ), 4.20 (q, 1H,  $J=7.0$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 4.04 (m, 2H, H-4), 2.61 (d, 3H,  $J=3.9$ ,  $\text{CH}_3\text{-NH}$ ), 2.23 (m, 1H, H-3), 2.11 (m, 1H, H-3), 1.55 (s, 3H, 2- $\text{CH}_3$ , Aza),

1.17 (d, 3H,  $J=7.0$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.10 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ - $^t\text{Bu}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Diastereoisómero mayoritario:  $\delta$  178.5 (CO- $^t\text{Bu}$ ), 174.5 (2-CO), 173.8 (CO-Ala), 72.1 (2-C), 45.8 (4-C), 44.9 ( $\alpha$ -C, Ala). 38.6 (C- $^t\text{Bu}$ ), 27.4 ( $\text{CH}_3$ - $^t\text{Bu}$ ), 27.0 (3-C), 26.2 ( $\text{CH}_3$ -NH), 23.5 (2- $\text{CH}_3$ , Aza), 17.9 ( $\beta$ -H, Ala): Diastereoisómero minoritario:  $\delta$  178.0 (CO- $^t\text{Bu}$ ), 173.8 (2-CO), 172.7 (CO-Ala), 71.5 (2-C), 45.8 (4-C), 45.2 ( $\alpha$ -C, Ala), 38.6 (C- $^t\text{Bu}$ ), 27.8 (3-C), 27.4 ( $\text{CH}_3$ - $^t\text{Bu}$ ), 26.2 ( $\text{CH}_3$ -NH), 23.1 (2- $\text{CH}_3$ , Aza), 17.2 ( $\beta$ -H, Ala). EM (ES modo positivo): 284.0  $[\text{M}+1]^+$ , 306.0  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$ : C, 59.34; H, 8.89; N, 14.83. Anal. Exp. (%): C, 59.16; H, 8.71; N, 14.53.



**Piv-Ala-(S)-Azf-NHMe [(S)-42c]:** Sólido. P.f. 102-104 °C. Rdto. 65 % [A partir de (S)-40c, Método A]. Eluyente: MeOH: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:100).  $[\alpha]_{\text{D}} = +13.0$  ( $c=0.18$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). HPLC:  $t_{\text{R}} = 2.61$  min (A:B=40:60).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.16 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 7.36-7.12 (m, 5H, Ph), 6.49 (d, 1H,  $J=7.2$ , NH-Ala), 4.31 (q, 1H,  $J=7.2$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.64 (m, 1H, H-4), 3.58 (d, 1H,  $J=13.8$ , 2-CH<sub>2</sub>, Azf), 3.16 (m, 1H, H-4), 2.97 (d, 1H,  $J=13.8$ , 2-CH<sub>2</sub>, Azf), 2.87 (d, 3H,  $J=4.7$ ,  $\text{CH}_3$ -NH), 2.75 (ddd, 1H,  $J=12.1$ , 9.8, 7.3, H-3), 2.24 (ddd, 1H,  $J=12.1$ , 9.2, 4.9, H-3),

1.27 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ - $^t\text{Bu}$ ), 1.26 (d, 3H,  $J=7.2$ ,  $\beta$ -H, Ala).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  8.04 (m, 1H, NH-CH<sub>3</sub>), 7.49 (d, 1H,  $J=7.1$ , NH-Ala), 7.31-7.18 (m, 5H, Ph), 4.22 (q, 1H,  $J=7.1$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.79 (m, 1H, H-4), 3.38 (d, 1H,  $J=13.5$ , 2-CH<sub>2</sub>, Azf), 3.20 (m, 1H, H-4), 3.02 (d, 1H,  $J=13.5$ , 2-CH<sub>2</sub>, Azf), 2.68 (d, 3H,  $J=4.8$ ,  $\text{CH}_3$ -NH), 2.26 (m, 1H, H-3), 2.02 (m, 1H, H-3), 1.18 (d, 3H,  $J=7.1$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.11 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ - $^t\text{Bu}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  181.0 (CO- $^t\text{Bu}$ ), 174.4 (CO-Ala), 174.0 (2-CO), 134.6 (C-Ph), 130.2, 128.5, 127.4 (CH-Ph), 75.7 (2-C), 46.0 (4-C), 45.0 ( $\alpha$ -C, Ala), 39.5 (2-CH<sub>2</sub>, Azf), 38.6 (C- $^t\text{Bu}$ ), 27.4 ( $\text{CH}_3$ - $^t\text{Bu}$ ), 26.3 ( $\text{CH}_3$ -NH), 22.7 (3-C), 18.1 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 360.3  $[\text{M}+1]^+$ , 382.3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$ : C, 66.83; H, 8.13; N, 11.69. Anal. Exp. (%): C, 66.71; H, 8.22; N, 11.78.



**Piv-Ala-(S)-Azf-NH<sup>i</sup>Pr [(S)-45c]:** Sólido. P.f. 123-125 °C. Rdto. 58 % [A partir de (S)-44c, *Método C*]. Gradiente de 33 a 66 % de AcOEt en hexano.  $[\alpha]_D = +2.4$  ( $c=0.81$ , CHCl<sub>3</sub>). HPLC:  $t_R = 4.13$  min (A:B=40:60). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.92 (d, 1H,  $J=7.2$ , NH-<sup>i</sup>Pr), 7.28-7.13 (m, 5H, Ph), 6.07 (d, 1H,  $J=6.9$ , NH-Ala), 4.05 (q, 1H,  $J=6.9$ ,  $\alpha$ -H, Ala), 3.97 (m, 1H, CH-<sup>i</sup>Pr), 3.87 (ddd, 1H,  $J=9.7$ , 8.3, 5.6, H-4), 3.48 (d, 1H,  $J=13.9$ , 2-CH<sub>2</sub>, Azf), 2.99 (m, 1H, H-4), 2.96 (d, 1H,  $J=13.9$ , 2-CH<sub>2</sub>, Azf), 2.54 (ddd, 1H,  $J=12.0$ , 9.7, 6.6, H-3), 2.22 (ddd, 1H,  $J=12.0$ , 9.4, 5.6, H-3), 1.14 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu), 1.14-1.10 (m, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>i</sup>Pr,  $\beta$ -H, Ala). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  7.73 (d, 1H,  $J=6.8$ , NH-<sup>i</sup>Pr), 7.68 (d, 1H,  $J=4.8$ , NH-Ala), 7.34-7.17 (m, 5H, Ph), 3.95-3.85 (m, 2H, H-4, CH-<sup>i</sup>Pr), 3.78 (dc, 1H,  $J=7.1$ , 4.8,  $\alpha$ -H, Ala), 3.31 (d, 1H,  $J=13.9$ , 2-CH<sub>2</sub>, Azf), 3.04 (m, 1H, H-4), 3.00 (d, 1H,  $J=13.9$ , 2-CH<sub>2</sub>, Azf), 2.15 (t, 2H,  $J=7.7$ , H-3), 1.12 (d, 3H,  $J=6.8$ , CH<sub>3</sub>-<sup>i</sup>Pr), 1.11 (d, 3H,  $J=7.1$ ,  $\beta$ -H, Ala), 1.11 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu), 1.06 (d, 3H,  $J=6.8$ , CH<sub>3</sub>-<sup>i</sup>Pr). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  178.4 (CO-<sup>t</sup>Bu), 172.9 (CO-Ala), 172.2 (2-CO), 135.4 (C-Ph), 130.8, 128.3, 127.1 (CH-Ph), 74.8 (2-C), 45.8 (4-C), 45.1 ( $\alpha$ -C, Ala), 41.5 (CH-<sup>i</sup>Pr), 39.2 (2-CH<sub>2</sub>, Azf), 38.4 (C-<sup>t</sup>Bu), 27.5 (CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu), 23.0 (3-C), 22.6 (CH<sub>3</sub>-<sup>i</sup>Pr), 22.4 (CH<sub>3</sub>-<sup>i</sup>Pr), 16.8 ( $\beta$ -C, Ala). EM (ES modo positivo): 388.3 [M+1]<sup>+</sup>, 410.2 [M+Na]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 68.19; H, 8.58; N, 10.84. Anal. Exp. (%): C, 68.11; H, 8.52; N, 11.01.

### 1.7.9. Estudios de Dinámica Molecular.

Los estudios de dinámica molecular se llevaron a cabo en una estación de trabajo SGI (Fuel, RP14000, 500MB RAM) utilizando el sistema operativo IRIX 6.5. Las conformaciones iniciales de los dipéptidos objeto de estudio se construyeron utilizando los fragmentos de la librería disponible en el programa de modelización molecular Insight II (versión 2000.1, Biosym Tech., San Diego, CA, USA). Los cálculos de mecánica molecular se realizaron utilizando el campo de fuerzas AMBER implementado en el módulo de DISCOVER. Para los cálculos se utilizó una constante dieléctrica dependiente de la distancia (4r) y para las interacciones no enlazantes una distancia máxima de 16 Å. Las estructuras se calentaron a 1000K, se estabilizaron durante 100 ps y se enfriaron lentamente a 300 K. En cada paso la temperatura se disminuyó de 100 K en 100 K,

manteniéndose la nueva temperatura durante 100 ps en cada etapa. Después del enfriamiento a 300 K, las conformaciones resultantes se optimizaron utilizando el método de minimización del gradiente conjugado y como criterio de convergencia 0.001 Kcal Å<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>. Los confórmeros se almacenaron y utilizaron como punto de partida para una nueva modelización a alta temperatura. Este proceso dio lugar a 100 conformaciones de mínima energía, que se compararon entre sí con el fin de eliminar las repetidas y las que poseían una energía superior a 3 Kcal mol<sup>-1</sup> con respecto al mínimo global. Este protocolo se repitió tres veces, utilizando distintas estructuras de partida para cada dipéptido objeto de estudio.

### 1.7.10. Cristalografía de Rayos X.

Datos cristalográficos para (*S*)-45c:

Fórmula empírica	C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	
Peso molecular	387.52	
Temperatura	120 (2) K	
Número de ondas	1.54184 Å	
Sistema cristalino	Hexagonal	
Grupo espacial	P6	
Dimensiones de la celda:	a = 21.8480(5) Å	α = 90.00°
	b = 21.8480(5) Å	β = 90.00°
	c = 9.1920(2) Å	γ = 120.00°
Volumen	3799.83(15) Å <sup>3</sup>	
Z	6	
Densidad	1.016 mg/m <sup>3</sup>	
Coefficiente de absorción	0.542 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	1260	
Rango de θ en la recogida de datos	2.34 a 62.30°	
Indice de rangos	24 ≤ h ≤ 25, -21 ≤ k ≤ 21, -10 ≤ l ≤ 10	
Números de reflexiones recogidas	3834	
Reflexiones independientes	2061	
Corrección de absorción	Ninguna	
Max. y min. de transmisión	0.9135 y 0.7734	
Método de refinamiento	Refinamiento de F <sup>2</sup> sobre todas las reflexiones.	
Datos / restricciones / parámetros	2061 / 1 / 261	
Bondad del ajuste F <sup>2</sup>	1.486	
Índice final de R [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0519, wR2 = 0.1769	
Índices de R (total de datos)	R1 = 0.0562, wR2 = 0.1860	
Máx. y min. de densidad electrónica	407 y -0.587 e Å <sup>-3</sup>	

Tabla 16. Coordenadas atómicas ( $10^4$ ) y parámetros de desplazamiento isotrópico equivalente ( $\text{\AA}^2 10^3$ ) para **(S)-45c**.  $U(\text{eq})$  está definido como  $1/3$  de la traza del tensor ortogonalizado  $U^{ij}$ .

	x	y	z	U (eq)
<b>O1</b>	6484(1)	8058(1)	3924(3)	42(1)
<b>O2</b>	5416(1)	9363(1)	2744(3)	36(1)
<b>O3</b>	6922(1)	11118(1)	599(3)	42(1)
<b>N1</b>	6552(2)	9612(2)	2616(3)	34(1)
<b>N2</b>	5575(2)	8277(2)	4028(4)	39(1)
<b>N3</b>	6064(2)	10889(1)	2212(4)	34(1)
<b>C1</b>	6502(2)	8922(2)	2264(4)	34(1)
<b>C2</b>	7317(2)	9310(2)	2221(5)	39(1)
<b>C3</b>	7332(2)	10015(2)	2518(4)	37(1)
<b>C4</b>	6184(2)	8377(2)	3507(4)	35(1)
<b>C5</b>	5175(2)	7782(2)	5200(4)	37(1)
<b>C6</b>	4992(2)	8164(2)	6338(5)	48(1)
<b>C7</b>	4521(2)	7143(2)	4575(5)	46(1)
<b>C8</b>	6098(2)	8570(2)	858(5)	40(1)
<b>C9</b>	6455(2)	8927(2)	-544(4)	43(1)
<b>C10</b>	6571(2)	9589(2)	-921(5)	49(1)
<b>C11</b>	6921(3)	9907(3)	-2206(6)	64(1)
<b>C12</b>	7130(3)	9537(3)	-3150(6)	77(2)
<b>C13</b>	7019(3)	8897(4)	-2801(6)	74(2)
<b>C14</b>	6682(3)	8574(3)	-1485(5)	60(1)
<b>C15</b>	6066(2)	9798(2)	2818(4)	31(1)
<b>C16</b>	6333(2)	10572(2)	3226(4)	34(1)
<b>C17</b>	6095(2)	10595(2)	4771(5)	41(1)
<b>C18</b>	6403(2)	11158(2)	934(4)	34(1)
<b>C19</b>	6103(2)	11512(2)	-52(5)	38(1)
<b>C20</b>	6635(2)	11894(2)	-1283(5)	50(1)
<b>C21</b>	6006(2)	12058(2)	815(5)	45(1)
<b>C22</b>	5405(2)	10952(2)	-666(5)	48(1)

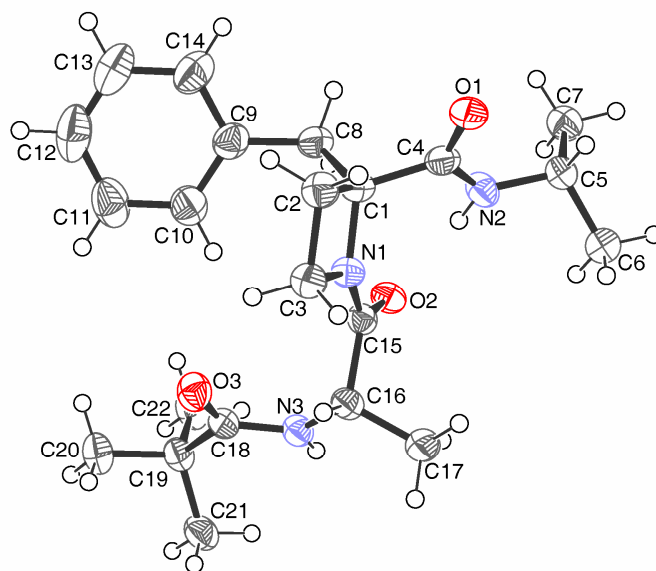


Figura 26. Representación ORTEP del compuesto **(S)-45c** con numeración de átomos.





## **CAPÍTULO 2**

### **ANÁLOGOS CONFORMACIONALMENTE RESTRINGIDOS DE FRAGMENTOS DE NGF Y BDNF**

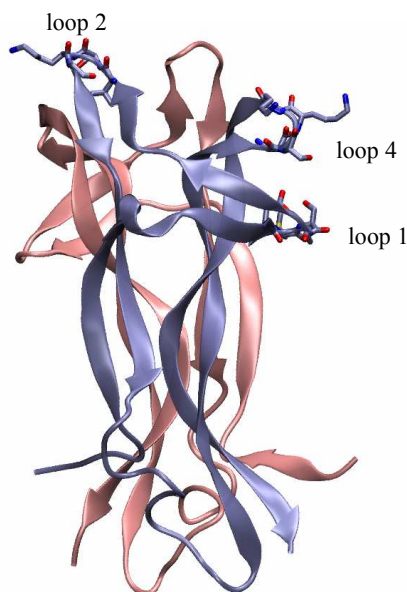
---



## 2.1. Introducción.

Las neurotrofinas (NT), son factores de crecimiento diméricos que promueven el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia neuronal *in vitro* e *in vivo*, y son críticas en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central y periférico<sup>161,162</sup>. La primera neurotrofina que se identificó fue el factor de crecimiento nervioso (NGF, nerve growth factor), aislada a partir de veneno de serpiente en el año 1956 por Levi-Montalcini y Cohen<sup>163,164</sup>, descubrimiento que les llevó a obtener el premio Nobel en 1986. Posteriormente se han aislado otros miembros de la familia como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, brain derived neurotrophic factor), la neurotrofina-3 (NT-3), la neurotrofina-4/5 (NT-4/5), la neurotrofina-6 (NT-6) y la neurotrofina-7 (NT-7)<sup>162,165,166</sup>. Cabe destacar que las neurotrofinas NT-6 y NT-7 se han aislado sólo de peces y no se ha identificado su equivalente en mamíferos. Las neurotrofinas, como otros muchos factores de crecimiento, se generan a partir de una proteína precursora, la cual se procesa para dar lugar a la forma madura, que posee aproximadamente 120 aminoácidos y en el medio biológico forman homodímeros estables y no covalentes<sup>167</sup>. Las NTs pertenecen a la superfamilia de “nudos de cisteína”, que tienen en común la presencia de tres enlaces disulfuros intercadenas. Cada monómero consiste en un par láminas  $\beta$  antiparalelas, con tres horquillas  $\beta$  en uno de los extremos (loops 1, 2 y 4) y un giro inverso en el otro. En los dímeros, las dos subunidades se empaquetan cabeza-cabeza a través de una serie de residuos hidrofóbicos a lo largo de las hojas  $\beta$  (Figura 27)<sup>167,168</sup>.

Las NTs ejercen su acción biológica mediante la unión a dos receptores de transmembrana, un receptor tirosina quinasa (Trk, tropomyosine-related kinase) al que se unen selectivamente, y el receptor p75 por el que todas las NTs presentan afinidades similares. Además, cuando ambos receptores están co-expresados se crea un sitio de unión de alta afinidad<sup>165,169</sup>. Se han aislado tres receptores Trk en vertebrados (TrkA, TrkB y TrkC), que presentan selectividad por diferentes neurotrofinas: TrkA se activa por NGF y en menor proporción por NT-3, TrkB principalmente por BDNF y NT-4/5, y TrkC por NT-3<sup>165,169</sup>. La unión de las neurotrofinas a sus receptores Trk causa dimerización y activación del dominio intracelular de tirosina quinasa, iniciando la cascada intracelular de señales de transducción<sup>161,170,171</sup>. Así, las neurotrofinas inducen, entre otras actividades, proliferación y supervivencia neuronal, crecimiento y remodelación axonal y dendrítica, y ensamblado y remodelación del citoesqueleto<sup>170</sup>.

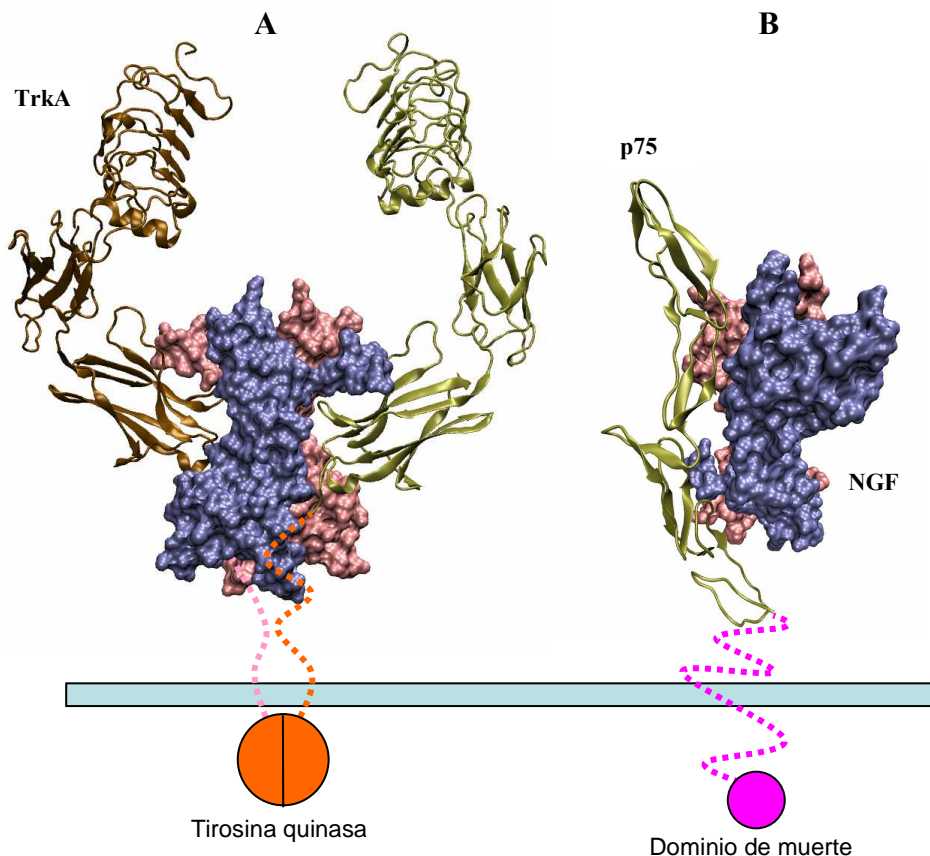


*Figura 27.* Representación en forma de cintas de un dímero de neurotrofina en el que se muestran los aminoácidos integrantes de los loops 1, 2 y 4 en uno de los monómeros.

La estructura tridimensional del complejo entre el dominio extracelular del receptor TrkA y NGF se ha determinado recientemente por cristalografía de Rayos X<sup>172</sup>. Estos estudios han mostrado que la porción extracelular está formada por varios dominios, y han permitido validar hipótesis anteriores realizadas en base a las homologías con otros receptores de estructura 3D conocida<sup>165</sup>. Así, la parte extracelular está constituida por cinco dominios: una región rica en leucina (LRR-D2), flanqueada por dos dominios ricos en cisteína (CD-D1 y CD-D3) formando un único dominio estructural, y a continuación se encuentran dos dominios de inmunoglobulina (Ig-D4 y Ig-D5). Con anterioridad al año 2007, tan sólo se había caracterizado por cristalografía de Rayos X la estructura 3D del dominio de inmunoglobulina Ig-D5 de los receptores Trk, que constituye la principal interfaz para la interacción con las NTs<sup>172,173</sup>. La Figura 28A muestra una representación de la estructura cristalina del complejo entre un dímero de NGF y la parte extracelular de dos unidades del receptor TrkA.

Por otra parte, p75 es una glicoproteína de transmembrana, que se une con similar afinidad a todas las NTs, pero con cinéticas diferentes<sup>174</sup>. Este receptor carece de actividad catalítica intrínseca, pero puede activar diferentes rutas de señalización celular a través del reclutamiento de otras proteínas<sup>161,171</sup>. P75 pertenece a la de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral y en su parte intracelular posee un dominio

denominado de muerte<sup>175</sup>. La estructura cristalina del complejo entre NGF y la porción extracelular de p75 muestra que dicho complejo está formado por un homodímero de NGF unido a un único receptor p75, que en su porción extracelular contiene cuatro dominios ricos en cisteína (Figura 28B)<sup>172</sup>. La unión de las neurotrofinas a p75 puede promover efectos diametralmente opuestos en función de la cascada de señales que activa dentro de las células. Así, puede causar apoptosis en células que expresan niveles altos de este receptor, y nula o baja activación de los receptores Trk, o por el contrario, puede promover supervivencia celular, crecimiento neuronal, etc<sup>161,171,176</sup>. El receptor p75 puede también regular la función de los receptores Trk. Así, se ha observado que la unión de neurotrofinas a p75 aumenta la afinidad de los sitios de unión de los receptores Trk, su autofosforilación y su selectividad frente a las NTs<sup>170,177</sup>.



*Figura 28.* Representación de la estructura de Rayos X de los complejos entre un dímero de NGF y los dominios extracelulares de TrkA (A) y p75 (B), donde se ha dibujado esquemáticamente la parte intracelular del receptor. El dímero de NGF se ha representado como una superficie, mientras que TrkA y p75 se representan en forma de cintas.

Las alteraciones en la señalización de las neurotrofinas y sus receptores son relevantes en una serie de patologías humanas, incluyendo neurodegeneración aguda o crónica (Alzheimer, Parkinson, epilepsia, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica), dolor, depresión, obesidad y ciertos tipos de cáncer<sup>165,178</sup>. El efecto neuroprotector de las neurotrofinas en modelos animales generó altas expectativas centradas en sus posibles aplicaciones clínicas en enfermedades neurodegenerativas, motivando el inicio de una serie de estudios clínicos. Sin embargo, debido probablemente a razones multifactoriales, no se consiguieron los resultados esperados<sup>179-181</sup>. Una parte importante de estos fracasos se atribuyó a los inconvenientes inherentes al uso de proteínas como fármacos, como baja estabilidad *in vivo*, baja penetración en el sistema nervioso central y malas propiedades farmacocinéticas, además de efectos pleiotrópicos. Recientemente se han explorado rutas alternativas de administración no invasivas como la intranasal, con objeto de intentar liberar NGF en cerebro a través del nervio olfativo y/o trigémino. En estos ensayos NGF ha sido capaz de recuperar a ratones AD11 de rasgos característicos de la degeneración de tipo Alzheimer<sup>182</sup>. Otra aproximación para intentar subsanar estos inconvenientes sería el desarrollo de moléculas pequeñas miméticas de las neurotrofinas que tuvieran mejores propiedades farmacocinéticas. En este sentido, los agonistas de los receptores de neurotrofinas podrían tener aplicaciones terapéuticas en el campo de la neuroprotección<sup>183,184</sup>, mientras que los antagonistas podrían ser de utilidad en el tratamiento de ciertos tumores<sup>185-188</sup> o para paliar el dolor óseo asociado a procesos cancerosos<sup>189</sup>.

En la búsqueda de miméticos de neurotrofinas se pueden utilizar aproximaciones de diseño racional, ya que se posee información de los residuos claves para la interacción con sus receptores, así como su organización tridimensional. Dentro de esta familia, el NGF ha sido el ligando más estudiado. Extensos estudios de mutagénesis dirigida y proteínas recombinantes, junto con el conocimiento de las estructuras cristalinas de NGF, de la porción extracelular de los receptores TrkA y p75, así como de los complejos entre los dominios extracelulares y NGF, han contribuido a definir las regiones de NGF implicadas en la interacción con sus receptores<sup>168,172,173,175,190,191</sup>. La determinación posterior de la estructura tridimensional de otras neurotrofinas, junto con la estructura cristalina del complejo entre NT-3 y el dominio 5 de los receptores TrkB y TrkC, así como nuevos estudios de mutagénesis dirigida, han permitido confirmar la especial relevancia de una serie de loops localizados en la superficie de las NTs, que adoptan

estructura de horquilla  $\beta$ <sup>172,173,191-194</sup>. Además, la diversidad de secuencia observada en estas regiones de las NTs, sugiere que estos loops pueden ser potencialmente importantes para definir las especificidades por los receptores Trk.

Diferentes estudios realizados sobre NGF han identificado el extremo *N*-terminal (1-8) como una región importante para conferir especificidad por los receptores TrkA, mientras que los residuos *C*-terminales (111-115) se encuentran implicados en la activación del receptor<sup>165,169,190</sup>. Además, experimentos de mutagénesis han mostrado la importancia de los residuos de los loops 1 (30-35), 2 (40-49) y 4 (91-97), para la unión a su receptor TrkA<sup>165,169</sup>. Por otra parte, los rasgos estructurales importantes para la unión a los receptores p75 implican residuos cargados, localizados en los loops 1, 3 y 4 de NGF<sup>195</sup>. Los estudios llevados a cabo sobre BDNF han sido menos exhaustivos. Sin embargo, han permitido identificar regiones importantes para la unión a TrkB, como los loops 2 y 4<sup>193,196,197</sup>, estando este último loop implicado también en la interacción con p75. En base a estos estudios, distintos grupos han diseñado y sintetizado una serie de péptidos lineales y cíclicos derivados de los fragmentos importantes para la afinidad de NGF y BDNF<sup>169,198</sup>. Su evaluación biológica ha mostrado que algunos análogos conformacionalmente restringidos, capaces de adoptar estructura de giro  $\beta$ , poseen interesantes propiedades biológicas. Las primeras aproximaciones en la búsqueda de miméticos de estos giros se basaron en la generación de péptidos cíclicos que contuvieran su secuencia. Así, péptidos cíclicos a través de puente disulfuro basados en la secuencia de los loop 2 y 4 de diferentes NTs han mostrado capacidad para antagonizar la unión entre las NTs y sus receptores, como el mimético de NGF **A**<sup>48,199</sup> o el de BDNF **B**<sup>197</sup> (Figura 29). La afinidad de estos compuestos se correlaciona con la adopción de conformaciones de giro  $\beta$  dado que sus correspondientes análogos lineales son inactivos. En base a la naturaleza dimérica de las NTs, se exploró si miméticos diméricos de estos loops podrían facilitar la dimerización de los receptores y comportarse como agonistas. Así, se prepararon análogos diméricos de los loop 1 y 4 de NTs<sup>197,200,201</sup>. Los ensayos biológicos han mostrado que algunos de estos compuestos son capaces de comportarse como agonistas. Como ejemplos ilustrativos, la Figura 29 recoge el mimético de NGF **C** y el agonista parcial de BDNF **D**.

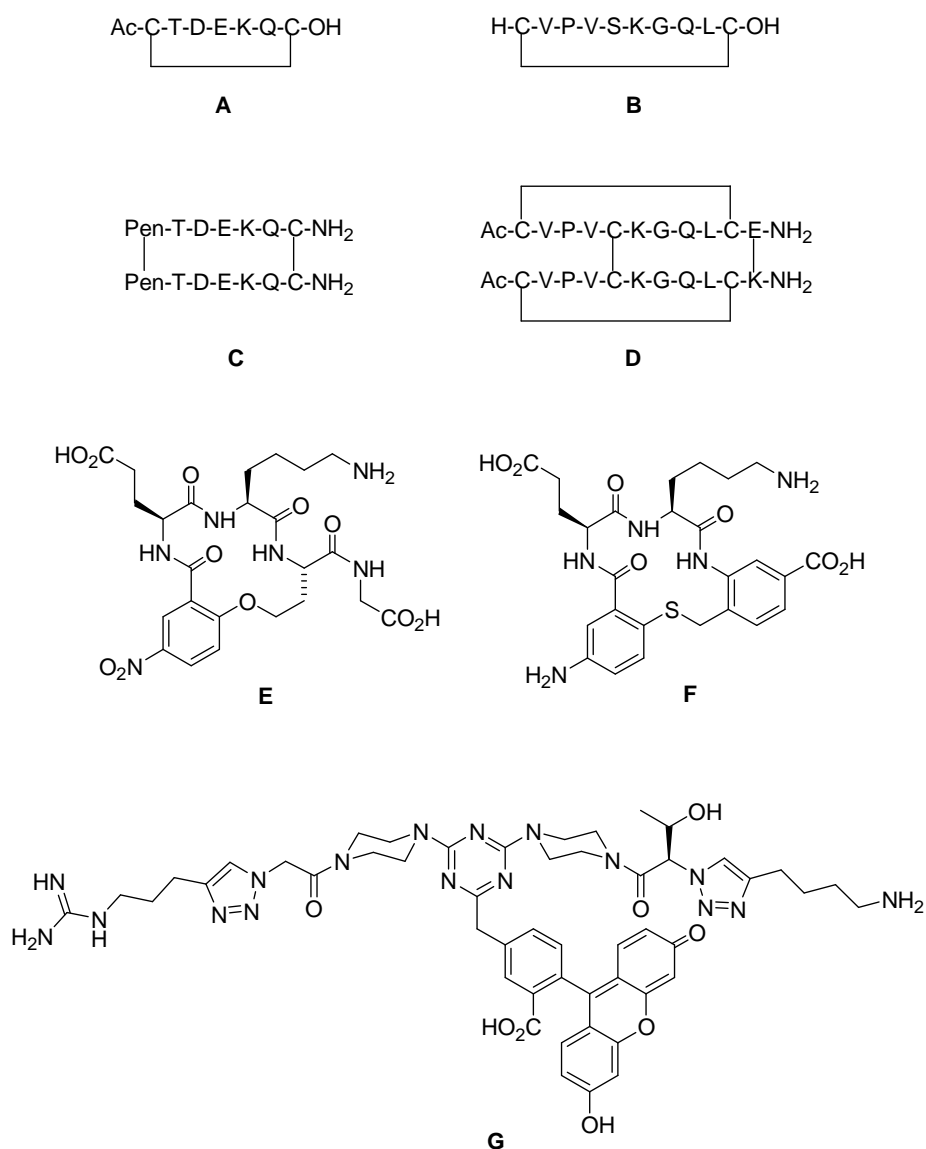


Figura 29. Ejemplos de miméticos de neurotrofinas.

Posteriormente, y en base a modelos de farmacóforos contruidos a partir de distintos análogos peptídicos capaces de unirse a los receptores de NGF, se diseñó una librería dirigida de peptidomiméticos macrocíclicos, de entre los cuales el compuesto **E** se comportó como agonista selectivo de los receptores TrkA<sup>202</sup>. Este resultado indica que los ligandos monoméricos del receptor TrkA son capaces de comportarse como agonistas. El siguiente paso en la búsqueda de miméticos de NGF fue la preparación de análogos de giros más rígidos que mantuvieran los rasgos estructurales de los residuos en las



posiciones  $i+1$  e  $i+2$ <sup>49</sup>, como el antagonista de NGF **F** (Figura 29). Muy recientemente, y con objeto de conseguir interacciones a través de varios sitios de unión, se han desarrollado metodologías adecuadas para la preparación de quimiotecas de ligandos bivalentes diseñados en base a los loops de NGF que incorporan miméticos de giros  $\beta$  y están marcados con fluoresceína para facilitar los ensayos biológicos<sup>203</sup>. Varios de los peptidomiméticos preparados se unieron a los receptores Trk, y algunos de ellos, como el derivado **G**, mostraron selectividad por los receptores TrkA frente a TrkC.



## 2.2. Objetivos.

Este capítulo tiene por objetivo general la obtención de nuevos miméticos de neurotrofinas, tomando como patrón de diseño una serie de loops presentes en la estructura nativa y que han demostrado ser importantes para la interacción con sus receptores. El objetivo consistiría en fijar la estructura tridimensional de estos fragmentos, para lo se han abordado dos aproximaciones que pretenden, respectivamente, el estudio de:

1. Análogos lineales de los loops 1 y 4 de NGF, en los que se intenta estabilizar la conformación de estos loops a través de la incorporación de aminoácidos conformacionalmente restringidos, capaces de inducir giros inversos, en posiciones  $i+1$  e  $i+2$ .
2. Análogos cíclicos de los loops 2 y 4 de BDNF. En esta segunda aproximación se reduce la libertad conformacional de estos fragmentos mediante su inserción en estructuras cíclicas. A este fin se seleccionaron una serie de espaciadores que permitieran unir los extremos *N*- y *C*-terminales de los loops para intentar mantener la estructura de giro  $\beta$  que poseen en la proteína nativa.

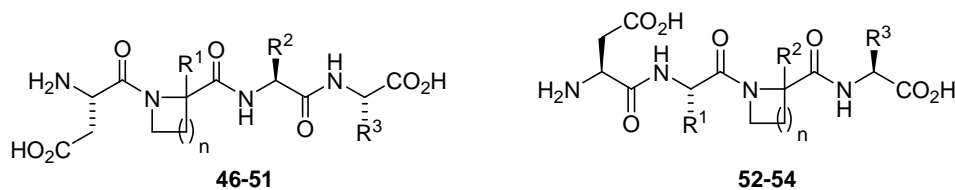


## **2.3. Análogos de fragmentos de NGF importantes para la actividad.**

### **2.3.1. Diseño.**

Para el diseño de miméticos de NGF seleccionamos fragmentos peptídicos de su secuencia descritos como importantes para la interacción con sus receptores, en concreto los loops 1 (Asp-Ile-Lys-Gly) y 4 (Asp-Gly-Lys-Gln, humano; Asp-Glu-Lys-Gln, ratón), así como el loop 1 de NT-3 (Asp-Ile-Arg-Gly), que al igual que NGF se une a los receptores TrkA. Estudios de Rayos X han mostrado que estos loops adoptan estructura de giro  $\beta$ . Dada la importancia de la estructura secundaria en los procesos de reconocimiento molecular, se diseñaron péptidos análogos de estos fragmentos que incorporaran aminoácidos conformacionalmente restringidos, con objeto de intentar mimetizar su estructura 3D (Figura 30). En particular, se seleccionaron Pro y  $\alpha$ -MePro, dos residuos conocidos por inducir giros  $\beta$ <sup>67</sup>, para reemplazar el residuo de Gly de la posición i+1 del loop 4 (derivados **46** y **47**). Alternativamente, se utilizó también el aminoácido natural 2-carboxiazetidina (Azc) que también se ha postulado como inductor de giros  $\beta$  (**48**)<sup>89</sup>. Como se ha comentado en el capítulo anterior, en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado un procedimiento sintético para la formación de 2-alkyl-2-carboxiazetidinas capaces de soportar cadenas laterales de aminoácidos naturales<sup>103-109</sup>. De esta forma se reemplazó el aminoácido en posición i+1 de la secuencia tetrapeptídica correspondiente al loop 1 ó 4, con estos derivados de azetidina adecuadamente sustituidos (compuestos **49-51**). Adicionalmente, y con objeto de explorar un mayor espacio conformacional, se ideó una serie de péptidos que incorporaran derivados de Azx en posición i+2 de la secuencia tetrapeptídica (**52-54**). Durante el transcurso de nuestros estudios para determinar la conformación fijada por derivados de 2-alkyl-2-carboxiazetidinas, descritos en el capítulo 1 de este manuscrito, se observó que inducían preferentemente giros  $\gamma$ <sup>204,205</sup>, por lo que estos residuos no parecen a priori los más adecuados para incorporarse en estas secuencias. Sin embargo, los estudios conformacionales iniciales se realizaron con modelos simplificados, por lo que sería también de interés completar los estudios en modelos tetrapeptídicos reales. Además, las secuencias de los loops 1 y 4 de NGF resultaban especialmente atractivas para este fin, ya que contienen un residuo de Asp en posición i, una localización muy favorecida en giros  $\beta$ , siendo el segundo aminoácido natural preferido en esta posición<sup>70</sup>, mientras que rara vez se encuentra en esta posición en giros  $\gamma$ . Adicionalmente, los estudios de

modelización y RMN en los modelos sencillos mostraron que también podían existir conformaciones de giros  $\beta$ , por lo que sería interesante conocer si los aminoácidos integrantes de la secuencia peptídica podían variar las preferencias conformacionales inducidas por los residuos de azetidina 2,2-disustituídos.



Compuesto	n	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
<b>46</b>	2	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
<b>47</b>		CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
<b>48</b>	1	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
<b>(R)- y (S)-49</b>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
<b>(S)-50</b>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	H
<b>(R)- y (S)-51</b>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHC(NH)NH <sub>2</sub>	H
<b>(S)-52</b>		H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
<b>(R)- y (S)-53</b>		(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
<b>(S)-54</b>		CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	H

Figura 30

Por otra parte, varios estudios han sugerido flexibilidad conformacional en el loop 4 de NGF. En este sentido, diferentes estructuras cristalinas de NGF han mostrado diferentes conformaciones para este fragmento<sup>167,172,173,176,191,206</sup>. Esto indica que se permite cierta flexibilidad en esta región y que su unión al receptor se realiza mediante un mecanismo inducido<sup>207</sup>. Así, la síntesis de péptidos lineales capaces de adoptar diferentes conformaciones podría suponer una ventaja en el entendimiento de la conformación bioactiva del loop 4.

Para explorar el espacio conformacional accesible a los tetrapéptidos miméticos del loop 1 (**50**, **51** y **54**) y del loop 4 (**46-49**, **52** y **53**), se realizaron primeramente estudios de dinámica molecular. En principio se analizaron todos los tetrapéptidos con configuración *S* en el carbono quiral de los residuos de Pro,  $\alpha$ -MePro y Azx, y adicionalmente también se incluyeron los de configuración *R* para los derivados **49**, **51** y **53**. Para los cálculos teóricos se utilizó AMBER como campo de fuerzas, siendo la metodología aplicada análoga a la empleada en los estudios de modelización molecular del capítulo anterior (apartado 1.3.2.1). Así, los diferentes conformeros obtenidos en un rango de 3 Kcal/mol respecto del mínimo global fueron clasificados en familias según los ángulos diedros  $\phi$  y  $\psi$  de los residuos centrales y las distancias correspondientes a los posibles enlaces de hidrógeno. En primer lugar y con objeto de analizar la rotamería existente en nuestros derivados tetrapeptídicos, se analizó el ángulo diedro ( $\omega$ ) en el que está implicado el nitrógeno del aminoácido conformacionalmente restringido (Pro,  $\alpha$ -MePro y Azx) y el grupo carbonilo del residuo precedente. Este análisis reveló que la conformación *trans* es la única presente en las familias de conformeros en una ventana de 3 Kcal/mol respecto del mínimo global, con la excepción de los derivados **46** (10 % de conformeros en disposición *cis*) y **53** (4 % conformeros *cis*). Seguidamente, se procedió a evaluar si existían enlaces de hidrógeno que estabilizaran determinadas conformaciones. Así, se analizaron las distancias entre el oxígeno de los diferentes grupos carbonilo y los protones NH de estos derivados tetrapeptídicos. Por simplicidad en la discusión de resultados, se han analizado los derivados tetrapeptídicos que incorporan los aminoácidos conformacionalmente restringidos en posiciones i+1 e i+2 en bloques separados.

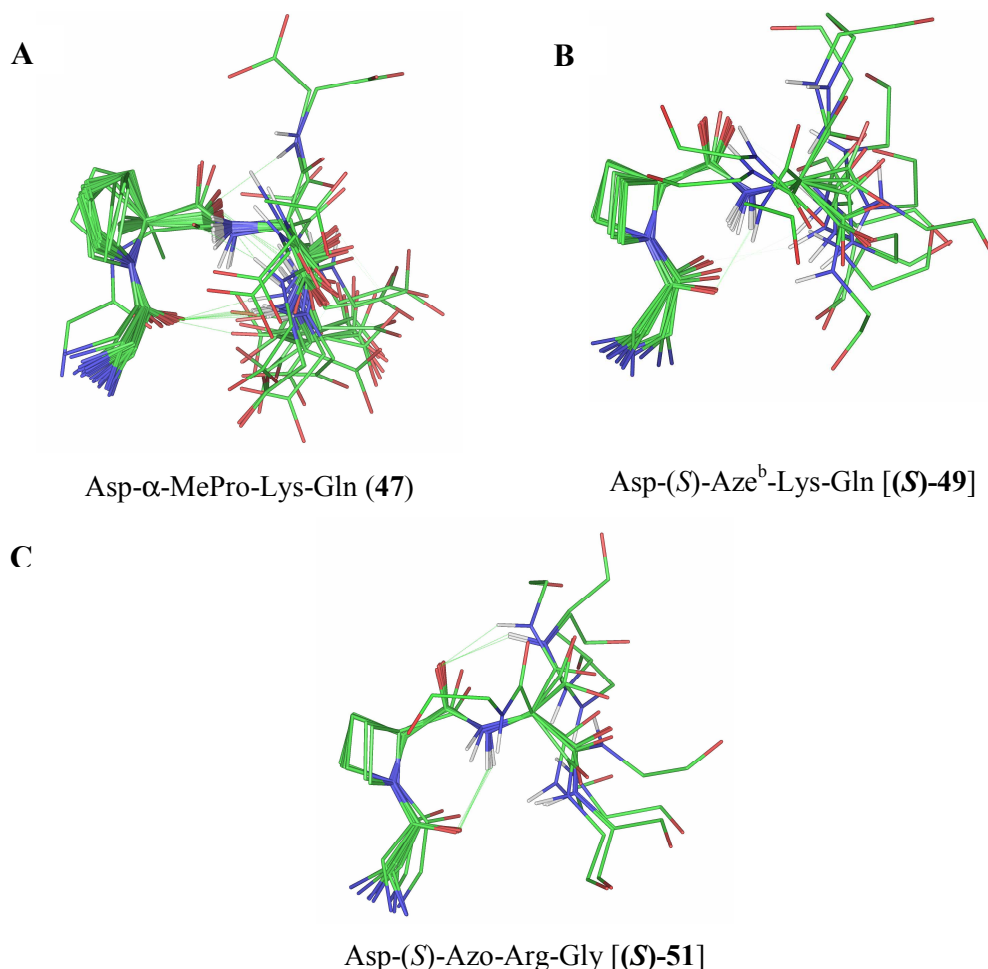
En primer lugar, se analizaron los resultados obtenidos en los estudios teóricos de los derivados que incorporan el residuo de Azx, Pro o  $\alpha$ -MePro en posición i+1 de la secuencia tetrapeptídica (derivados **46-51**). Se observó que los tetrapéptidos que contienen Pro (**46**) o  $\alpha$ -MePro (**47**) poseen un enlace de hidrógeno entre el protón NH del residuo de Lys (NH amídico en posición i+2) y el oxígeno del grupo carbonilo de la cadena lateral de Asp (35 % y 40 % de conformeros, respectivamente). Además, el tetrapéptido que incorpora un residuo de  $\alpha$ -MePro (**47**, Figura 31A) presenta un 27 % de conformeros con un enlace de hidrógeno entre el protón amida del residuo i+2 y el CO-Asp (i), característico de giros  $\gamma$ . Por otra parte, este enlace de hidrógeno también se observa en los péptidos con un residuo de azetidina en posición i+1 (compuestos **48-51**),

variando su porcentaje desde bajo, como en el derivado **48** (19 %), a moderado-alto para **(S)-49** (82 %), **(R)-49** (100%), **50** (49 %), **(S)-51** (82 %) y **(R)-51** (100 %). Por lo tanto, este enlace de hidrógeno característico de giros  $\gamma$  aumenta en porcentaje al introducir disustitución en el carbono 2 del anillo de azetidina. Estos resultados están de acuerdo con los estudios descritos en el primer capítulo de esta Tesis. Adicionalmente, existe enlace de hidrógeno entre el protón amida  $\text{NH}^{i+2}$  y el oxígeno del agrupamiento carbonilo de la cadena lateral de Asp en los derivados **48** (31 %) y **50** (17 %).

Por otra parte, el protón amídico  $\text{NH}^{i+3}$  de los péptidos que incorporan un residuo de Azx en posición  $i+1$  está, en general, implicado en enlace de hidrógeno intramolecular, existiendo variabilidad en relación al oxígeno carbonílico que actúa como aceptor. Así, los estudios teóricos muestran que el NH-Gly o NH-Gln ( $\text{NH}^{i+3}$ ) presenta un enlace con el CO-Azx, CO-Asp o el grupo carbonilo de las cadenas laterales de Asp o Gln. El enlace de hidrógeno entre el protón  $\text{NH}^{i+3}$  y el CO-Asp se corresponde con el característico de giros  $\beta$  y su porcentaje entre las familias de mínima energía es bajo, siendo solo superior al 13 % para los compuestos **47**, **(R)-49** y **(R)-51**.

En conjunto, los estudios de modelización molecular realizados sobre los derivados tetrapeptídicos que contienen un residuo conformacionalmente restringido en posición  $i+1$  sugieren variabilidad conformacional y poca o nula tendencia a estabilizar estructuras de giros  $\beta$ , con la posible excepción de los derivados **47**, **(R)-49** y **(R)-51**. Por otra parte, los péptidos con un residuo de 2-carboxiazetidina en posición  $i+1$  favorecen conformaciones de giros  $\gamma$ , centrados en el anillo de Azx, observándose una mayor flexibilidad conformacional en el extremo C-terminal (Figuras 31B y 31C). Los datos obtenidos en estos estudios están de acuerdo con las preferencias conformacionales descritas en el capítulo anterior para los dipéptidos modelo que contienen derivados de Pro y Azx. De nuevo, como se ha indicado en el capítulo 1, la tendencia a adoptar conformaciones de giros inversos ( $\beta$  o  $\gamma$ ) se incrementa cuando el residuo de prolina o azetidina posee sustitución en el carbono  $\alpha$  del anillo.





*Figura 31.* Superposición de conformeros de mínima energía (+ 3 Kcal/mol del mínimo global) de los análogos que contienen un residuo conformacionalmente restringido en posición i+1. Por simplicidad, las cadenas laterales y los hidrógenos, excepto los de los grupos amida, han sido eliminados.

A continuación se analizaron los resultados de los estudios de dinámica molecular para los compuestos que contienen un residuo de Azx en posición i+2 (derivados **52-54**). El estudio conformacional mostró la existencia de un enlace de hidrógeno entre el protón NH del residuo en posición i+3 (Gly o Gln) y oxígeno del grupo carbonilo del residuo i+1, CO-Gly para **52** (94 %), CO-Glu para (*S*)-**53** (91 % de conformeros) y CO-Ile para el derivado **54** (76 %), propio de giros  $\gamma$ . Por otra parte, los estudios de modelización molecular mostraron que el NH del residuo en posición i+1 no

<sup>b</sup> Aze= azetidina derivada de Glu, Azo= azetidina derivada de Nle, Azk= azetidina derivada de Lys.

participa en la formación de enlaces de hidrógeno en el derivado **54**, mientras que en los derivados **52** (40 % de confórmeros) y (**S**)-**53** (17 %) este NH está implicado en un enlace de hidrógeno con el oxígeno del grupo carbonilo de la cadena lateral del residuo de Gln o Asp, respectivamente.

En las Figuras 32A y 32B se encuentran recogidos dos ejemplos de superposición de confórmeros de mínima energía para derivados con un residuo de Azx en posición i+2, donde se observa la tendencia general a fijar una estructura 3D donde existe un giro  $\gamma$  en el extremo C-terminal, y una mayor flexibilidad conformacional alrededor del extremo N-terminal.

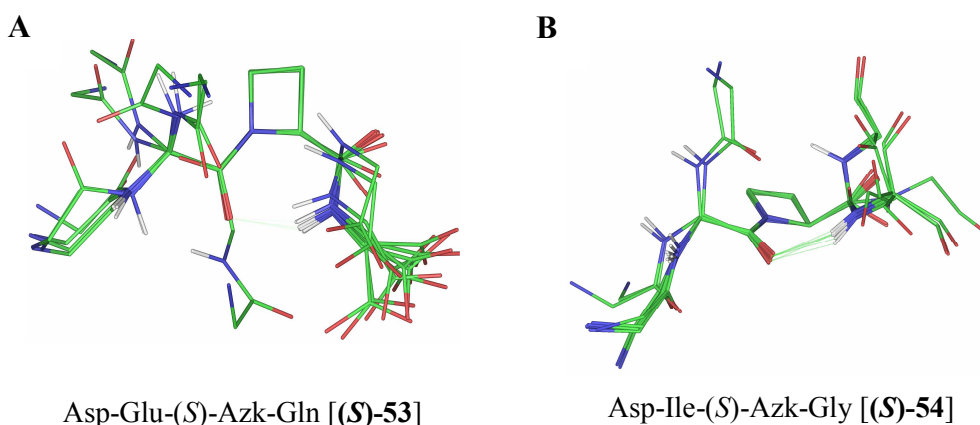


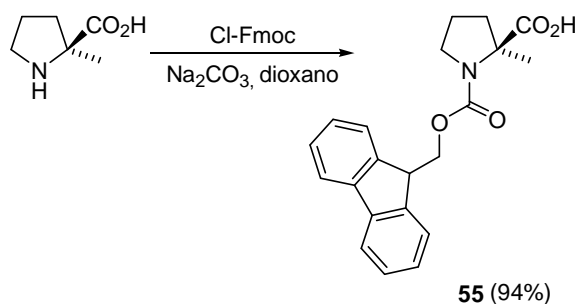
Figura 32. Superposición de confórmeros de mínima energía (+ 3 Kcal/mol del mínimo global) de los análogos que contienen un residuo de Azk en posición i+2. Por simplicidad, las cadenas laterales y los hidrógenos, excepto los de los grupos amida, han sido eliminados.

En conjunto, cabe destacar que los resultados de los estudios de modelización molecular para estos derivados tetrapeptídicos confirman la capacidad mostrada por los derivados de 2-alkyl-2-carboxiazetidinas para inducir giros inversos en péptidos pequeños. Además, a pesar de que nuestros tetrapéptidos contienen un residuo de Asp en posición i, que suele estabilizar giros  $\beta^{70}$ , los estudios teóricos realizados sugieren que los derivados de 2-alkyl-2-carboxiazetidinas inducen preferentemente giros  $\gamma$  en estas cadenas peptídicas. Aunque estos resultados no auguran un buen mimetismo conformacional entre los péptidos diseñados y los fragmentos de NGF tomados como patrón, que poseen estructura de giro  $\beta$ , se decidió realizar la síntesis de los compuestos **46-54**, no tanto con el fin de conseguir ligandos de los receptores de NGF, sino para

comprobar la fiabilidad y reproducibilidad de los datos teóricos, en comparación con los estudios experimentales en disolución. El objetivo principal sería el reforzar la validez de los derivados de Azx como inductores de giros  $\gamma$ , y por lo tanto su utilidad general para fijar esta estructura secundaria.

### 2.3.2. Síntesis.

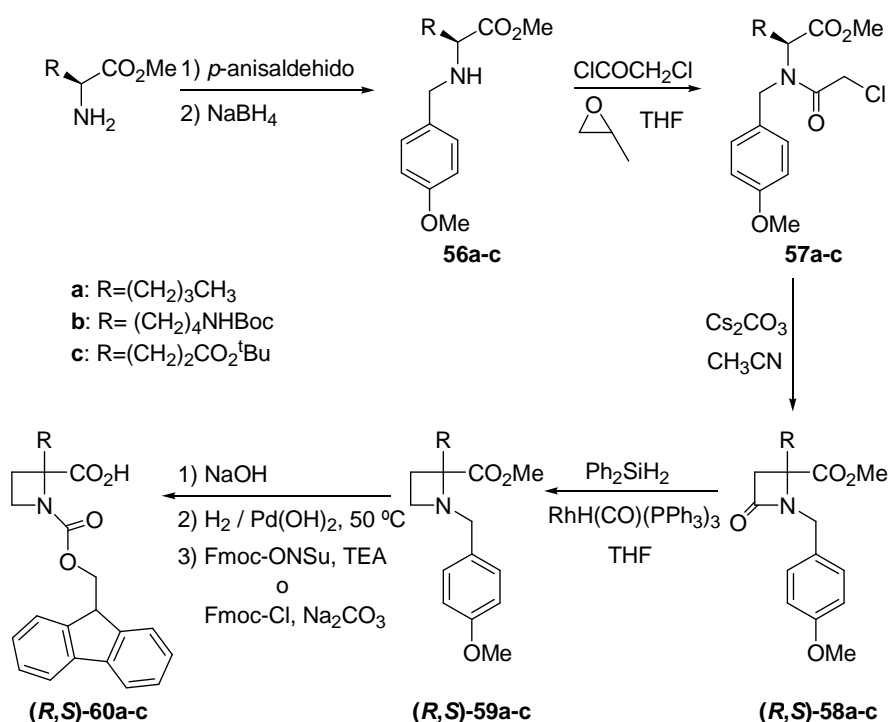
La preparación de los derivados tetrapeptídicos diseñados como análogos de los loops 1 (**50**, **51** y **54**) y 4 (**46-49**, **52** y **53**) de NGF se realizó siguiendo procedimientos de síntesis en fase sólida y utilizando Fmoc-aminoácidos convenientemente protegidos. En este sentido, fue necesaria la preparación de Fmoc- $\alpha$ -MePro-OH (**55**), que se sintetizó en un solo paso a partir de H- $\alpha$ -MePro-OH (Esquema 19). La acilación de H-MePro-OH en H<sub>2</sub>O/dioxano utilizando Fmoc-Cl condujo al derivado **55** con un 94 % de rendimiento.



Esquema 19

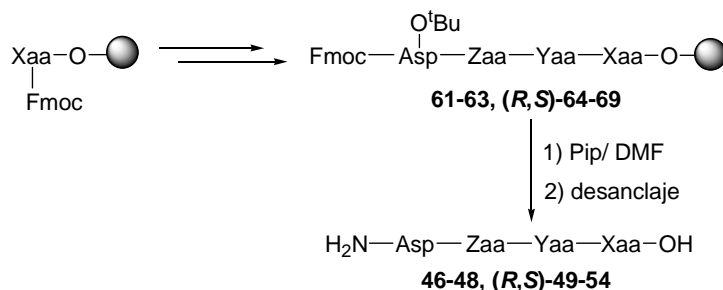
Por otra parte, también resultó necesario preparar los derivados de azetidina no comerciales Fmoc-Azo-OH [(*R,S*)-**60a**], Fmoc-Azk(Boc)-OH [(*R,S*)-**60b**] y Fmoc-Aze(O<sup>t</sup>Bu)-OH [(*R,S*)-**60c**], para lo que se utilizó la metodología sintética recogida en el Esquema 20, que es análoga a la seguida para la síntesis de los derivados de azetidina (*R,S*)-**10b,c** (Esquema 3, página 42). El primer paso de la ruta sintética consistió en la preparación de los *N*-parametoxibencilderivados **56a-c** (82-95 %). Seguidamente se llevó a cabo la acilación del grupo amino con cloruro de cloroacetilo, obteniéndose los derivados **57a-c** con rendimientos prácticamente cuantitativos. La posterior ciclación intramolecular de dichos derivados utilizando Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como base dio lugar a las  $\beta$ -lactamas (*R,S*)-**58a-c** en forma racémica (67-76 % de rendimiento). La reducción selectiva del carbonilo del anillo de  $\beta$ -lactama se realizó utilizando Ph<sub>2</sub>SiH<sub>2</sub> como agente reductor y RhH(CO)(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub> como catalizador, obteniéndose las azetidinas

**(R,S)-59a-c** con buenos rendimientos (70-83 %). A continuación se saponificó el éster metílico en posición 2 del anillo de azetidina de los derivados **(R,S)-59a-c**, seguido de hidrogenación catalítica del grupo *p*-(metoxi)bencilo y, finalmente, se procedió a la protección del NH del anillo de azetidina mediante incorporación de un grupo Fmoc. Para ello, se intentó en primer lugar la acilación con *N*-Fmoc-succinimida. Sin embargo, la aparición de importantes cantidades de subproductos, junto con el bajo rendimiento obtenido en la formación del derivado **(R,S)-60a** (32 %), motivó la búsqueda de estrategias sintéticas alternativas para la formación de las Fmoc-azetidinas **(R,S)-60b,c**. La utilización de cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (Fmoc-Cl) como agente acilante en disolución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, condujo a un aumento significativo del rendimiento en la obtención de **(R,S)-60b,c** (60-65 % de rendimiento), así como a purificaciones más sencillas de los crudos de reacción. En los espectros de <sup>1</sup>H RMN de los derivados **(R,S)-60a-c** desaparece el singlete correspondiente a la señal del éster metílico del grupo *p*-(metoxi)bencilo, mientras que se observan un doblete y un triplete bastante desapantallados correspondientes a los protones alifáticos del agrupamiento Fmoc, además de las correspondientes señales de tipo aromático de este grupo.



Esquema 20

Una vez preparados los aminoácidos de partida no comerciales **55** y **(R,S)-60a-c** se procedió a la síntesis de los derivados tetrapeptídicos **46-48** y **(R,S)-49-54** utilizando procedimientos de síntesis en fase sólida, a partir de resinas Wang convenientemente funcionalizadas. En este sentido, para la obtención de los tetrapéptidos **46-48**, **(R,S)-49**, **(R,S)-52** y **(R,S)-53** se utilizó una resina *N*-Fmoc-Gln(Trt)-Wang ( $f=0.59$  mmol de péptido/g de resina), mientras que para la preparación de los compuestos **(R,S)-50**, **(R,S)-51** y **(R,S)-54** se eligió la resina *N*-Fmoc-Gly-Wang ( $f=0.82$  mmol de péptido/g de resina). La preparación de estos péptidos se llevó a cabo siguiendo metodologías de síntesis en fase sólida mediante una estrategia Fmoc/<sup>t</sup>Bu, utilizando HOBt y DIC como reactivos de acoplamiento (Esquema 21). Las reacciones fueron monitorizadas mediante el test de Kaiser (cuando se realizaron acoplamientos sobre aminas primarias) o el test de clorano (al efectuarse acoplamientos sobre aminas secundarias). Todos los ensayos de presencia de aminas resultaron negativos tras un único acoplamiento, excepto los realizados sobre la azetidina derivada de lisina, protegida con un grupo *tert*-butoxicarbonilo en la cadena lateral, que necesitaron de un segundo acoplamiento.



Cpto.	Xaa	Yaa	Zaa
<b>46</b>	Gln	Lys	Pro
<b>47</b>	Gln	Lys	α-MePro
<b>48</b>	Gln	Lys	Azg
<b>(R,S)-49</b>	Gln	Lys	Aze
<b>(R,S)-50</b>	Gly	Lys	Azo
<b>(R,S)-51</b>	Gly	Arg	Azo
<b>(R,S)-52</b>	Gln	Azk	Gly
<b>(R,S)-53</b>	Gln	Azk	Glu
<b>(R,S)-54</b>	Gly	Azk	Ile

Cpto.	Xaa	Yaa	Zaa
<b>61</b>	Gln(Trt)	Lys(Boc)	Pro
<b>62</b>	Gln(Trt)	Lys(Boc)	α-MePro
<b>63</b>	Gln(Trt)	Lys(Boc)	Azg
<b>(R,S)-64</b>	Gln(Trt)	Lys(Boc)	Aze(O <sup>t</sup> Bu)
<b>(R,S)-65</b>	Gly	Lys(Boc)	Azo
<b>(R,S)-66</b>	Gly	Arg(Pbf)	Azo
<b>(R,S)-67</b>	Gln(Trt)	Azk(Boc)	Gly
<b>(R,S)-68</b>	Gln(Trt)	Azk(Boc)	Glu(O <sup>t</sup> Bu)
<b>(R,S)-69</b>	Gly	Azk(Boc)	Ile

Esquema 21

Una vez sintetizados los péptidos **46-54** se procedió a la desprotección del extremo *N*-terminal y de las cadenas laterales, así como al desanclaje de la resina. En primer lugar se desprotegió el extremo *N*-terminal utilizando piperidina en DMF. Seguidamente se llevó cabo la escisión del péptido anclado a la resina en medio ácido junto con la desprotección de las cadenas laterales, utilizando diferentes scavengers según el grupo protector de las cadenas laterales. De esta forma, los derivados tetrapeptídicos que contienen Gln(Trt) en su secuencia [compuestos **61-63**, **(R,S)-64**, **(R,S)-67** y **(R,S)-68**] se desanclaron utilizando un cóctel TFA/EDT/TA/TIS/H<sub>2</sub>O y los tetrapéptidos **(R,S)-65** y **(R,S)-69** por tratamiento con TFA/H<sub>2</sub>O, mientras que el derivado que contiene Arg(Pbf) [**(R,S)-66**] se desancló y desprotegió mediante una mezcla de TFA/EDT/TA/fenol/H<sub>2</sub>O/TIS. Los rendimientos globales encontrados tras el desanclaje de los tetrapéptidos **61-69** fueron del 50-65 %. Como era de esperar, debido a la naturaleza racémica de los derivados de azetidina **(R,S)-60a-c**, los tetrapéptidos **(R,S)-49-54** se obtuvieron como parejas de diastereoisómeros. Con objeto de establecer la asignación inequívoca del carbono 2-C en estos compuestos, se llevó a cabo la separación de la pareja de diastereoisómeros del péptido **(R,S)-53** por HPLC semipreparativo.

### 2.3.3. Estudio conformacional por RMN.

El análisis conformacional de los derivados tetrapeptídicos en disolución se llevó a cabo mediante estudios de RMN. En primer lugar, se determinó la posible existencia de rotámeros *cis/trans* en torno al enlace amida entre el aminoácido conformacionalmente restringido y el residuo precedente (Xaa-Pro, Xaa- $\alpha$ MePro y Xaa-Azx; Azx= Azg, Azo, Aze, Azk). La asignación de los isómeros *cis/trans* se realizó siguiendo los criterios descritos en el apartado 1.4.2.3 (página 61)<sup>57,139-142,208</sup>. Tan sólo en los espectros de <sup>1</sup>H RMN de los derivados **46** y **48** se observó una clara duplicidad de señales, indicativo de la existencia de rotamería *cis/trans* (Tabla 17), mientras que el derivado de  $\alpha$ -MePro **47** mostró tan sólo la presencia de uno de los isómeros. Este rotámero, así como los mayoritarios de los compuestos **46** y **48** se asignaron como *trans*. El resto de derivados tetrapeptídicos que contienen un residuo de Azx racémico [**(R,S)-49-54**] presentaron, como era de esperar, duplicidad de señales atribuibles a la existencia de dos diastereoisómeros. Un análisis detallado de los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN sugirió que en algunos casos podría existir rotamería, aunque el porcentaje del isómero *cis* es inferior al 15 %. La Tabla 17 recoge los porcentajes de conformeros *cis* medidos a partir de los

espectros de  $^1\text{H}$  RMN para los derivados **46-48**. El porcentaje de rotámeros *cis* es mayor para el derivado tetrapeptídico que contiene Azg **48** (40 %), que para el derivado **46** que incorpora un residuo de prolina (18 %), como también se había observado previamente<sup>134,136</sup>.

Tabla 17. Proporción de rotámeros *cis* de los tetrapéptidos **46-48** medida en DMSO- $\text{d}_6$ .

Compuesto		% <i>Cis</i> (DMSO- $\text{d}_6$ )
Asp-Pro-Lys-Gln	<b>46</b>	18
Asp-MePro-Lys-Gln	<b>47</b>	0
Asp-Azg-Lys-Gln	<b>48</b>	40

Por otra parte, el estudio de la rotamería de las parejas de diastereoisómeros de los derivados (***R,S***)-**49-54** no permitió la asignación del rotámero mayoritario (en porcentaje superior al 85%), al no observarse señales de tipo nOe concluyentes, ni ser posible la aplicación de los otros criterios. Sin embargo, y en base a los datos precedentes para residuos de 2-alkil-2-carboxiazetidina (capítulo 1), los isómeros mayoritarios se asignaron también como *trans*.

Estos datos se correlacionan en general con los obtenidos previamente de los estudios de modelización, con la única excepción del derivado **48** (Asp-Azg-Lys-Gln) que muestra en disolución una población del 40 % de isómero *cis*, mientras que en los estudios teóricos ese isómero no estaba presente en el intervalo de energía estudiado.

Los compuestos (***R,S***)-**49-54** incorporan en su estructura un derivado de azetidina-2-carboxilato racémico, por lo que sería de esperar que los tetrapéptidos se obtuvieran como mezcla de 2 diastereoisómeros en proporción 1:1. Sin embargo, la integración cuidadosa de las señales desdobladas en los espectros de  $^1\text{H}$  RMN mostró que esta proporción variaba ligeramente en función de los aminoácidos integrantes de los tetrapéptidos (***R,S***)-**49-54**, debido a un proceso de resolución cinética durante la síntesis (Tabla 18).

Tabla 18. Proporción diastereoisomérica de los compuestos **(R,S)-49-54** medida en DMSO-d<sub>6</sub>.

Compuesto	Proporción de diastereoisómeros
Asp-Aze-Lys-Gln <b>(R,S)-49</b>	1.1:1
Asp-Azo-Lys-Gly <b>(R,S)-50</b>	1.2:1 <sup>a</sup>
Asp-Azo-Arg-Gly <b>(R,S)-51</b>	1.3:1
Asp-Gly-Azk-Gln <b>(R,S)-52</b>	2:1
Asp-Glu-Azk-Gln <b>(R,S)-53</b>	2:1
Asp-Ile-Azk-Gly <b>(R,S)-54</b>	2:1

<sup>a</sup> El porcentaje de diastereoisómeros es aproximado.

Cabe destacar la resolución cinética observada en la preparación de los péptidos que incorporan un residuo de Azk [**(R,S)-52-54**], donde los derivados tetrapeptídicos finales se encuentran en una proporción 2:1. Con objeto de asignar la configuración absoluta de los dos diastereoisómeros de los derivados tetrapeptídicos **(R,S)-49-54** se realizaron experimentos bidimensionales de tipo NOESY y ROESY. Desafortunadamente, no se obtuvieron señales de correlación que permitieran su asignación inequívoca, debido a la complejidad de los espectros de <sup>1</sup>H RMN. Con el fin de intentar conseguir datos adicionales que nos permitieran establecer la asignación de la estereoquímica en el 2-C del anillo de azetidina, se separó la pareja **(R,S)-53** y se registraron espectros NOESY para cada diastereoisómero aislado. El estudio del espectro NOESY del diastereoisómero minoritario mostró una señal nOe débil entre el protón α-Glu y el 1'-Azk, que no estaba presente en el diastereoisómero mayoritario. Estudios de modelización molecular de los tetrapéptidos **(S)-53** y **(R)-53** indicaron que la distancia entre estos protones en el isómero de estereoquímica *S* es menor que para el *R*, y adecuada para la existencia de nOe. Además, el isómero de configuración *S* dispone el protón α-Glu del mismo lado que la cadena lateral de Azk. Todos estos datos sugieren que la configuración en el carbono quiral del anillo de azetidina es *S* en el diastereoisómero minoritario, mientras que el mayoritario se corresponde con el péptido que posee un residuo de (*R*)-Azk. Una comparación cuidadosa de los espectros de <sup>1</sup>H RMN de los diastereoisómeros **(R)-** y **(S)-53** con los de los compuestos **52** y **54**, mostró que los desplazamientos de los protones y carbonos son muy similares entre los dos diastereoisómeros de cada compuesto, observándose pequeñas variaciones en el



protón H-3 y el carbono 3-C del anillo de azetidina (Tabla 19). Los desplazamientos químicos de los protones H-3 del diastereoisómero (**S**)-**53** son más próximos, como era de esperar, al diastereoisómero minoritario de **52** y **54**, por lo que su configuración absoluta en el carbono asimétrico del anillo de azetidina se asignó como *S*, mientras que en el diastereoisómero mayoritario sería *R*. Asimismo, se observó un ligero apantallamiento del 3-C en los diastereoisómeros minoritarios. Si se comparan los datos de desplazamiento químico del protón H-3 del análogo con un espaciador de Azg **48** (de configuración *S* en el 2-C del anillo de azetidina) con los de los derivados **52-54**, se observa que son más similares a los diastereoisómeros minoritarios, apoyando también la asignación de la estereoquímica en el 2-C de estos derivados como *S*.

Tabla 19. Desplazamientos químicos de H-3 y 3-C para los compuestos **48**, (**R,S**)-**52-54**.

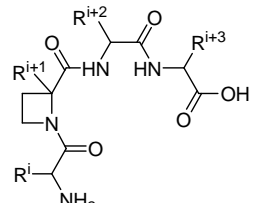
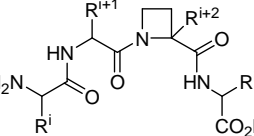
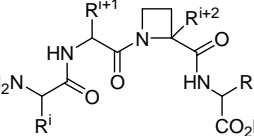
Compuesto		$\delta$ (ppm)		Estereoquímica Azx
		H-3	3-C	
<b>48</b>		2.46, 2.09	19.8	<i>S</i>
<b>(R,S)-52</b>	may.	2.39, 2.15	24.4	<i>R</i>
	min.	2.44, 2.15	24.1	<i>S</i>
<b>(R,S)-53</b>	may.	2.30, 2.22	23.9	<i>R</i>
	min.	2.50, 2.08	23.5	<i>S</i>
<b>(R,S)-54</b>	may.	2.36, 2.19	24.6	<i>R</i>
	min.	2.45, 2.11	23.9	<i>S</i>

Los intentos de determinar la configuración en el carbono asimétrico del residuo de Azx de los derivados (**R,S**)-**49-51** mediante el análisis detallado de sus espectros de RMN resultaron infructuosos. Sin embargo, la comparación de los resultados de los estudios de modelización molecular y los datos experimentales de RMN permitieron realizar una asignación tentativa de este centro quiral, siendo la configuración del diastereoisómero mayoritario *R* y la del minoritario *S*, como se detallará más adelante.

Seguidamente se evaluó la capacidad de los derivados tetrapeptídicos **46-54** para formar enlaces de hidrógeno que estabilizaran un determinado giro inverso. Para intentar identificar experimentalmente los posibles enlaces de hidrógeno en estos tetrapéptidos, y compararlos con los presentes en los loops de NGF, se calcularon los coeficientes de temperatura de los NH amídicos de los derivados **46-54**. En este sentido, la protección del

NH-Gly o NH-Gln (NH del aminoácido en posición i+3), podría ser indicativo de la adopción de una estructura secundaria de giro  $\beta$  por parte de los tetrapéptidos. En la Tabla 20 se encuentran recogidos los valores de  $\Delta\delta/\Delta T$  para los NH amida en posición i+1, i+2 e i+3 de la secuencia tetrapeptídica.

Tabla 20. Coeficientes de temperatura de los NH amídicos de los aminoácidos en posición i+1, i+2 e i+3.

Compuesto		$\Delta\delta/\Delta T$ (ppb/k) <sup>b</sup>			
		NH-i+1	NH-i+2	NH-i+3	
Asp-Pro-Lys-Gln	<b>46</b>	-	-5.7	-4.2	
Asp- $\alpha$ -MePro-Lys-Gln	<b>47</b>	-	<b>-2.1</b>	<b>-3.0</b>	
Asp-Azg-Lys-Gln	<b>48</b>	-	<b>-3.7</b>	<b>-3.7</b>	
Asp-Aze-Lys-Gln	<b>(R)-49<sup>a</sup></b>	-	<b>-0.6</b>	<b>-1.8</b>	
	<b>(S)-49<sup>a</sup></b>	-	<b>-2.8</b>	-4.9	
Asp-Azo-Lys-Gly	<b>(R)-50<sup>a</sup></b>	-	<b>-1.8</b>	-4.4	
	<b>(S)-50<sup>a</sup></b>	-	<b>-0.8</b>	nd <sup>c</sup>	
Asp-Azo-Arg-Gly	<b>(R)-51<sup>a</sup></b>	-	<b>-1.8</b>	<b>-2.7</b>	
	<b>(S)-51<sup>a</sup></b>	-	<b>-3.9</b>	-7.7	
Asp-Gly-Azk-Gln	<b>(R)-52</b>	<b>-3.6</b>	-	<b>-2.3</b>	
	<b>(S)-52</b>	<b>-3.8</b>	-	<b>-1.5</b>	
Asp-Glu-Azk-Gln	<b>(R)-53</b>	-4.6	-	<b>-1.9</b>	
	<b>(S)-53</b>	nd	-	<b>-2.0</b>	
Asp-Ile-Azk-Gly	<b>(R)-54</b>	-4.1	-	<b>-1.1</b>	
	<b>(S)-54</b>	-4.4	-	<b>-1.6</b>	

<sup>a</sup> La asignación se realizó tentativamente en base a los estudios de modelización molecular [(R), diastereoisómero mayoritario y (S), diastereoisómero minoritario]. <sup>b</sup>  $\Delta\delta$  medido en DMSO- $d_6$ , 30-60 °C (a intervalos de 5 °C). <sup>c</sup> No determinado.

De estos estudios a temperatura variable se desprende que cuando el aminoácido conformacionalmente restringido se encuentra en posición i+1 (derivados **46-51**), los coeficientes de temperatura del NH amídico en posición i+2 son, en general, compatibles con la existencia de enlace de hidrógeno intramolecular, mientras que cuando el aminoácido conformacionalmente restringido se sitúa en posición i+2 [compuestos **(R,S)-52-54**] es el NH<sup>i+3</sup> el que presenta inaccesibilidad al disolvente, posiblemente debido a la formación de un enlace de hidrógeno. Además, los derivados tetrapeptídicos

**47** ( $\alpha$ -MePro en posición  $i+1$ ) y los diastereoisómeros mayoritarios de **49** y **51** que contienen un residuo de Aze o Azo en posición  $i+1$  respectivamente, presentan también protección al disolvente del  $\text{NH}^{i+3}$ , por lo que los dos grupos amida de su cadena peptídica estarían implicados en enlaces de hidrógeno. Cabe destacar el diferente comportamiento que presentan los dos diastereoisómeros del compuesto **51** (Asp-Azo-Arg-Gly). Así, mientras el isómero mayoritario muestra protección de sus dos protones amida, los NHs de su diastereoisómero minoritario están expuestos al disolvente. Un comportamiento similar, aunque sin diferencias tan acusadas, presentan la pareja de diastereoisómeros de **49** (H-Asp-Aze-Lys-Gln-OH). Ambos diastereoisómeros poseen un enlace de hidrógeno intramolecular para el NH-Lys ( $\text{NH}^{i+2}$ ), pero solamente el mayoritario tiene protegido el NH del residuo de glutamina (NH en posición  $i+3$ ).

Aunque el estudio de los coeficientes de temperatura ha proporcionado información sobre los NH amida involucrados en enlaces de hidrógeno, no permiten dilucidar que grupo carbonilo está implicado en este enlace. Así, la protección del NH en posición  $i+2$  no indica necesariamente un giro  $\gamma$  en el que el oxígeno del grupo carbonilo del aminoácido en posición  $i+1$  sería el aceptor, ya que podría formarse un anillo de 10 eslabones con el carbonilo de la cadena lateral del ácido aspártico en posición  $i$ . Por otra parte, cuando el NH amídico de la posición  $i+3$  es el implicado en un enlace de hidrógeno intramolecular, puede estar formando parte de un giro  $\gamma$  o  $\beta$ , o formar un enlace de hidrógeno en el que participe la cadena lateral del residuo de Asp, como se refleja en la Figura 33.

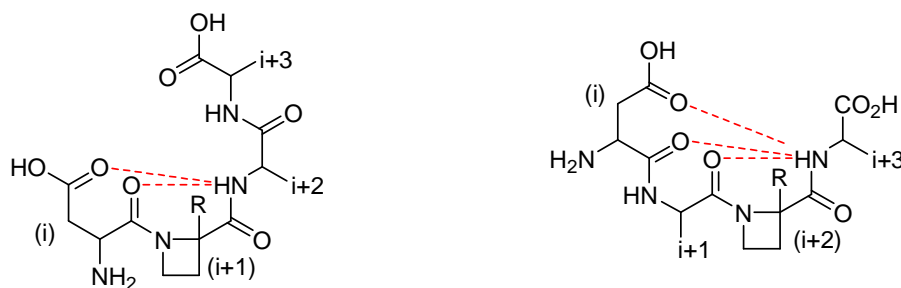


Figura 33. Posibles enlaces de hidrógeno intramoleculares que involucran a los NH amídicos en posición  $i+2$  e  $i+3$ .

Además, cuando el aminoácido en posición  $i+3$  es glutamina, su cadena lateral también podría estar involucrada en enlaces de hidrógeno. Con objeto de identificar los carbonilos implicados en estos enlaces y profundizar en el conocimiento de las

conformaciones presentes en disolución de los derivados tetrapeptídicos **46-54**, se realizaron experimentos de correlación espacial NOESY y ROESY. Desafortunadamente, los datos obtenidos de estos estudios no resultaron concluyentes, al no apreciarse señales de tipo nOe no secuenciales que proporcionaran información sobre la disposición 3D de estos péptidos y permitieran identificar la posible existencia de giros inversos.

Finalmente, se llevó a cabo una comparación cuidadosa de los datos experimentales de RMN y los de modelización molecular. Dentro de las familias de mínima energía obtenidas en los estudios teóricos de los tetrapéptidos que incorporan Pro y Azx en posición  $i+1$  (**46-51**), se observaron altos porcentajes, por encima del 50%, de confórmeros con enlace de hidrógeno  $\text{CO}^i \cdots \text{NH}^{i+2}$ , que se corresponde con el giro  $\gamma$  que normalmente inducen los derivados de 2-alquil-2-carboxiazetidinas. En los estudios de RMN se ha visto, en general, protección de ese NH amida, lo que sugiere que la disposición tridimensional preferida de estos tetrapéptidos es la de giro  $\gamma$ . Adicionalmente, en los estudios de modelización se observa protección del NH amídico en posición  $i+3$ , siendo diferente el grupo carbonilo implicado en el mismo. Es de señalar que solamente el enlace de hidrógeno formado entre el  $\text{CO}^i \cdots \text{NH}^{i+3}$ , característico del giro  $\beta$  y presente en el loop natural del NGF, que se observa en los estudios de dinámica molecular de los compuestos **47**, (**R**)-**49** y (**R**)-**51**, se correlaciona con los coeficientes de temperatura, lo que sugiere la presencia de confórmeros con estructura de giro  $\beta$  en estos derivados. El diferente comportamiento en cuanto a la capacidad para formar enlaces de hidrógeno de los diastereoisómeros *R* y *S* de **49** y **51** permitió la asignación tentativa, por comparación con los datos teóricos, del diastereoisómero mayoritario como *R*. Por otra parte, los resultados de los estudios de dinámica molecular de los derivados **52-54** que incorporan un residuo de Azk en posición  $i+2$ , sugieren la formación de un enlace de hidrógeno  $\text{CO}^{i+1} \cdots \text{NH}^{i+3}$  (más del 75 % de las familias de mínima energía). En los estudios de temperatura se ha confirmado la protección al disolvente de este NH, por lo que la conformación más probable también para estos derivados es la de giro  $\gamma$  centrado en el anillo de azetidina.

En resumen, los resultados de los estudios experimentales han apoyado los datos de modelización, mostrando que los derivados de Azx tienen tendencia a inducir giros  $\gamma$  también en secuencias tetrapeptídicas. Este hecho nos indica que estos análogos de NGF no van a ser capaces, en general, de mimetizar la estructura 3D de los loops de la proteína nativa, con la posible salvedad de los compuestos **47**, (**R**)-**49** y (**R**)-**51**. Por otra parte, la

capacidad inductora de giros  $\gamma$  de los derivados de 2-alquil-2-carboxiazetidina en estos tetrapéptidos, sin que les afecte significativamente ni su localización en la cadena ni los aminoácidos proteinogénicos que la integran, apoya la utilidad general de estos derivados para el estudio de la conformación bioactiva de péptidos.



## 2.4. Miméticos de fragmentos de BDNF importantes para la actividad.

### 2.4.1. Diseño.

La estructura cristalina de BDNF, y en particular la conformación 3D de los loops 2 y 4, se utilizó como patrón para el diseño de miméticos cíclicos de estos fragmentos. Así, se analizaron en primer lugar una serie de aminoácidos no proteinogénicos, como posibles espaciadores capaces de unir los extremos *N*- y *C*-terminales, manteniendo la estructura secundaria de giro  $\beta$  encontrada en los fragmentos nativos (la Figura 34 esquematiza esta estrategia para el loop 2). Como espaciadores se seleccionaron, inicialmente, los derivados comerciales ácido 2-amino-, 3-amino- o 4-aminobenzoico, ácido 2-amino-, 3-amino- o 4-aminociclohexanoico (analizando en estos tres últimos casos las cuatro posibles combinaciones estereoquímicas en los dos centros estereogénicos del anillo) y derivados de azetidina-2-carboxilato, cuya síntesis habíamos desarrollado en el grupo (explorando también las dos posibles estereoquímicas del carbono 2 del anillo de azetidina).

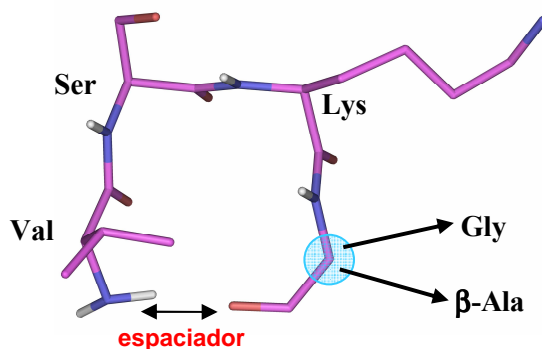


Figura 34. Representación del loop 2 de BDNF en el que se indican la posición donde se introduce el espaciador, así como las modificaciones en el residuo de Gly. Por simplicidad no se incluyen los hidrógenos, excepto para los grupos NH.

Tras la incorporación de estos aminoácidos no proteinogénicos en la secuencia nativa de los loops 2 y 4 de BDNF, como espaciadores que unieran los extremos *N*- y *C*-terminales, se realizaron una serie de dinámicas moleculares con objeto de conocer la disposición tridimensional de estos péptidos cíclicos. Los cálculos teóricos se llevaron a cabo utilizando AMBER como campo de fuerzas, usando una metodología idéntica a la empleada en el apartado 1.4.2.1. Así, los conformeros obtenidos en un rango de 3 Kcal/mol respecto del mínimo global se clasificaron en familias a partir de los ángulos

diedros  $\phi$  y  $\psi$  de los residuos centrales, y se analizaron las distancias  $\text{CO}\cdots\text{NH}$  para estudiar los posibles enlaces de hidrógeno intramoleculares en estos ciclopéptidos.

Las conformaciones de mínima energía obtenidas en los estudios de modelización molecular de los pentapéptidos cíclicos se superpusieron con las estructuras de Rayos X de los loop nativos, y a continuación, se seleccionaron aquellos espaciadores que conducían a conformaciones de mínima energía con una disposición tridimensional global del esqueleto peptídico de los análogos cíclicos, próxima a la de los loops 1 ó 4 nativos de BDNF. En este sentido, los mejores nexos para el loop 2 fueron el ácido (1*S*,2*S*)-2-aminociclohexanoico ( $\text{BAC}_6\text{C}$ ), (*S*)-azetidina-2-carboxilato ( $\text{Azg}$ ), (*S*)-2-metilazetidina-2-carboxilato [(*S*)-Aza] y (*R*)-2-metilazetidina-2-carboxilato [(*R*)-Aza]. Como se observa en la Figura 35A, las mayores desviaciones con respecto al loop nativo se encuentran en torno al aminoácido en posición *i* de estos fragmentos (Val). Con objeto de conferir una mayor flexibilidad conformacional a estos ciclos, se pensó en la sustitución del aminoácido Gly, presente en los loops nativos, por un residuo de  $\beta\text{Ala}$ . Los estudios de dinámica molecular mostraron que este espaciador confiere una mejor superposición en el residuo de Val, pero se observa variabilidad en el aminoácido en posición *i*+3 del giro ( $\beta\text{Ala}$ ), lo que era de esperar al haber reemplazado Gly por  $\beta\text{Ala}$  (Figura 35B).

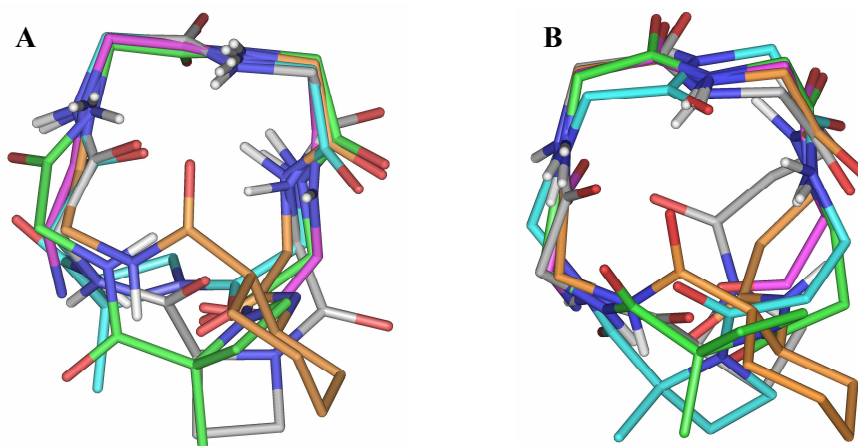
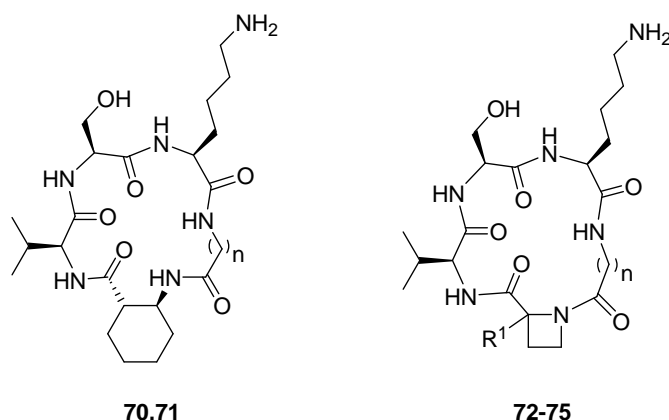


Figura 35. Superposición del esqueleto peptídico del loop 2 de BDNF (átomos de carbono en rosa) con **A**) mínimo global de ciclo(Val-Ser-Lys-Gly-Yaa) o **B**) mínimo global de ciclo(Val-Ser-Lys- $\beta\text{Ala}$ -Yaa). Yaa=  $\text{BAC}_6\text{C}$  (naranja), Azg (gris), (*S*)-Aza (verde), (*R*)-Aza (azul).



Considerando que tanto la presencia de Gly como de  $\beta$ Ala en los péptidos cíclicos análogos del loop 2 dan lugar a disposiciones tridimensionales compatibles con la estructura nativa, y con objeto de barrer un mayor espacio conformacional, se decidió preparar dos series de compuestos, una con un residuo de Gly como aminoácido en posición  $i+3$  del giro y otra con  $\beta$ Ala, y en cada una de ellas se utilizaron los cuatro espaciadores indicados (Figura 36).



Compuesto	70	71	72	73	(R)-74	(S)-74	(R)-75	(S)-75
n	1	2	1	2	1		2	
R <sup>1</sup>	-		H		Me			
espaciador	BAC <sub>6</sub> c		Azg		Aza			

Figura 36

El análisis de la rotamería *cis/trans* en torno al enlace amida Xaa-Azx de las familias de mínima energía de los derivados **72-75** mostró que el rotámero *trans* es el único presente en estos miméticos, excepto para los péptidos que contienen (*S*)-Aza-Gly [**(S)-74**, 22 % de población conformacional *cis*] y Azg-Gly (**72**, 83 % de isómero *cis*). A continuación se estudió la participación de los NH amídicos presentes en nuestros péptidos cíclicos en enlaces de hidrógeno. Es de señalar que la estructura nativa del loop 2 se corresponde a un giro  $\beta$  abierto, y por lo tanto sin enlace de hidrógeno (Figura 34), y de existir un enlace característico de giro  $\beta$ , éste tendría que formarse entre el grupo CO del residuo  $i$  (Val) y el protón amídico del residuo  $i+3$  (Gly).

En la Figura 37 se recogen los principales enlaces de hidrógeno encontrados para los compuestos que al igual que el loop nativo, poseen como residuo  $i+3$  Gly, y para los compuestos donde se sustituyó Gly por  $\beta$ Ala. Los estudios teóricos revelaron que los derivados que contienen Azx poseen estructuras tridimensionales similares. Así, todos estos derivados presentan enlaces de hidrógeno entre CO-Ser $\cdots$ NH-Gly (25-50 %, Figura 37A) y CO-Val $\cdots$ NH-Lys ( $\sim$ 55 %, Figura 37B). Además, más de un 70 % de los conformeros obtenidos para los derivados que incorporan  $\beta$ Ala **73** y (**S**)-**75** presentan otro enlace entre CO-Aza $\cdots$ NH-Ser (Figura 37A). Cabe destacar que todos estos enlaces de hidrógeno se corresponden con giros  $\gamma$ . Por otra parte, los derivados que contienen (*R*)-Aza presentan, cuando el enlace peptídico Xaa-Aza (Xaa= Gly,  $\beta$ Ala) es *trans*, el giro  $\gamma$  inducido por el anillo de azetidina, correspondiente a un enlace de hidrógeno CO-Xaa $\cdots$ NH-Val [(*R*)-**74**, 97 % y (*R*)-**75**, 87 %, Figura 37C].

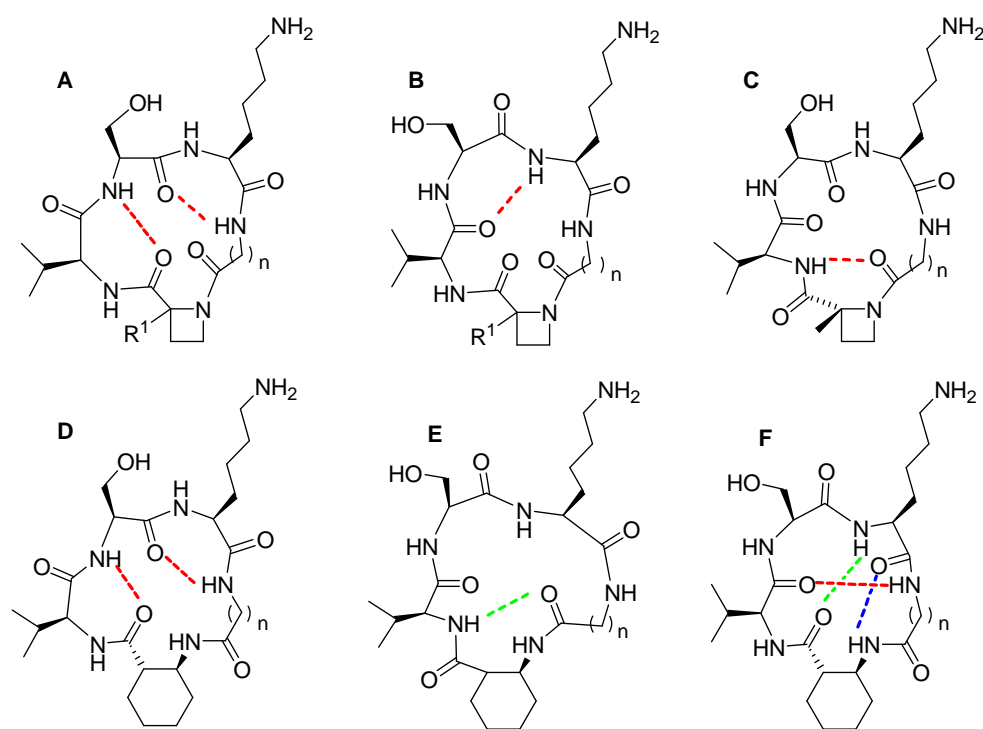


Figura 37. Representación de los enlaces de hidrógeno encontrados en los estudios de modelización molecular para los miméticos del loop 2 de BDNF que incorporan Gly ( $n=1$ ) o  $\beta$ Ala ( $n=2$ ) en posición  $i+3$ . En rojo se representan los enlaces de hidrógeno comunes a ambas series, en azul los que sólo presentan los compuestos que incorporan Gly y en verde los que sólo muestran los derivados con  $\beta$ Ala.

Finalmente, los estudios de modelización molecular de los derivados que incorporan BAc<sub>6</sub>c **70** y **71**, revelaron enlaces de hidrógeno entre CO-Ser...NH-Xaa (50-80 %, Figura 37D, Xaa= Gly, βAla) y CO-BAc<sub>6</sub>c...NH-Ser (65-80 %, Figura 37D), todos ellos giros γ. Adicionalmente, el derivado que incorpora Gly **70** presentó para la totalidad de sus conformeros otro enlace de hidrógeno entre CO-Lys...NH-BAc<sub>6</sub>c (Figura 37F), correspondiente a un giro γ, mientras que el compuesto con βAla **71** mostró un ciclo de ocho eslabones entre CO-βAla...NH-Val (61 %, Figura 37E). Por otra parte, cabe destacar que para los compuestos **70** y **71** se encontró un giro β entre CO-Val...NH-βAla (Figura 37F), correspondiente con el giro β de la proteína nativa, cuyo porcentaje aumentó con la sustitución de Gly por βAla. Así, mientras el derivado que incorpora Gly-BAc<sub>6</sub>c **70** muestra un 7 % de conformero con este enlace, el derivado de βAla **71** alcanzó un 30 %. Adicionalmente, un 83 % de los conformeros del mimético con βAla **71** revelaron otro giro β que involucra a CO-BAc<sub>6</sub>c...NH-Lys (Figura 37F).

Por otra parte, la estructura tridimensional del loop 4 de BDNF se corresponde también con un giro β abierto, donde existen enlaces de hidrógeno entre los protones amídicos de los residuos de Lys3 y Arg del esqueleto peptídico y el grupo carbonilo de la cadena lateral de Asp (Figura 38).

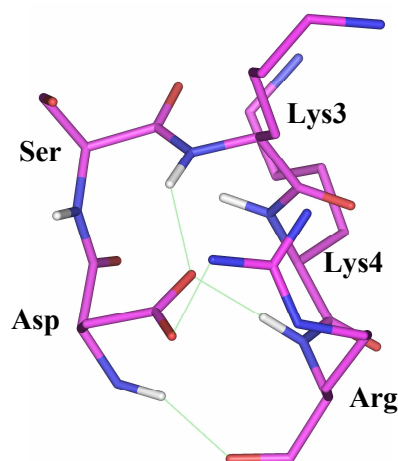


Figura 38. Representación del loop 4 de BDNF nativo. Por simplicidad no se incluyen los hidrógenos, excepto para los grupos NH.

El análisis de los estudios de modelización molecular de los análogos del loop 4 mostró que tanto un residuo de ácido (1*S*,2*S*)-2-aminociclohexanoico como uno de Azg, podrían considerarse adecuados para mantener la estructura 3D de este loop (Figura 39).

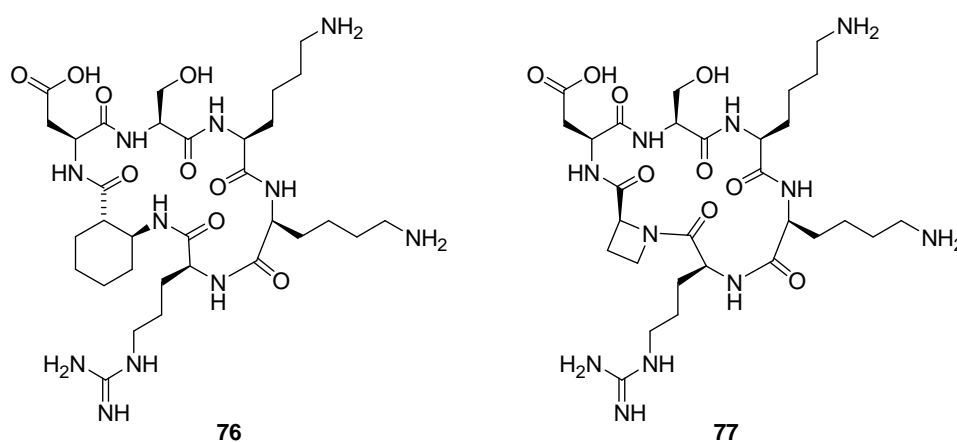


Figura 39

La Figura 40 recoge la superposición del loop 4 de BDNF con el mínimo global de los macrociclos **76** y **77** diseñados, donde se puede observar una buena superposición de la parte central del giro de la proteína nativa y los miméticos sintetizados, mientras que en la zona del espaciador existen mayores diferencias.

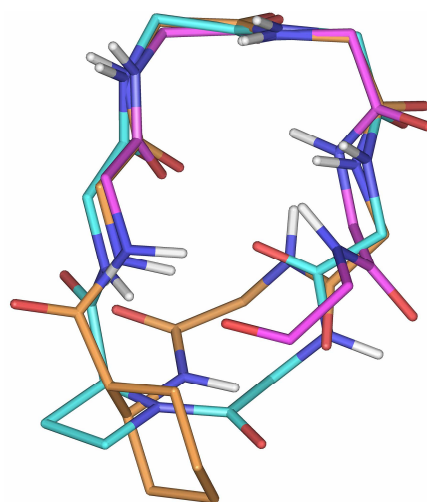


Figura 40. Superposición del esqueleto peptídico del loop 4 de BDNF (átomos de carbono en rosa) con el mínimo global de ciclo(Asp-Ser-Lys-Lys-Arg-Yaa). Yaa= BAc<sub>6</sub>c (naranja), Azg (azul).

El análisis de los resultados de los estudios de modelización molecular de los miméticos del loop 4 de BDNF muestra que el mimético que contiene Azg **77** presenta, en un 43 % de los conformeros de mínima energía, un enlace de hidrógeno CO-Asp $\cdots$ NH-Lys4(lat)<sup>c</sup> (Figura 41A), mientras que en menor medida se aprecia también otro enlace de hidrógeno donde el NH del residuo de Ser actúa como donador y el grupo carbonilo de Lys4 o Asp(lat) como aceptor de hidrógeno (Figura 41A). Por otra parte, el mimético **76** que contiene un anillo de BAc<sub>6</sub>c, muestra mayor número de enlaces de hidrógeno, y en mayor proporción. Así, los enlaces de hidrógeno de mayor relevancia observados para este ciclohexapéptido son CO-Lys4 $\cdots$ NH-BAc<sub>6</sub>c (82 %, Figura 41B), CO-Ser $\cdots$ NH-Arg (64 %, Figura 41C) y finalmente uno entre el NH amídico del residuo de Ser como dador de hidrógeno, mientras que como aceptor podría actuar el oxígeno carbonílico de BAc<sub>6</sub>c (36 %, Figura 41B) o Arg (36 %, Figura 41C).

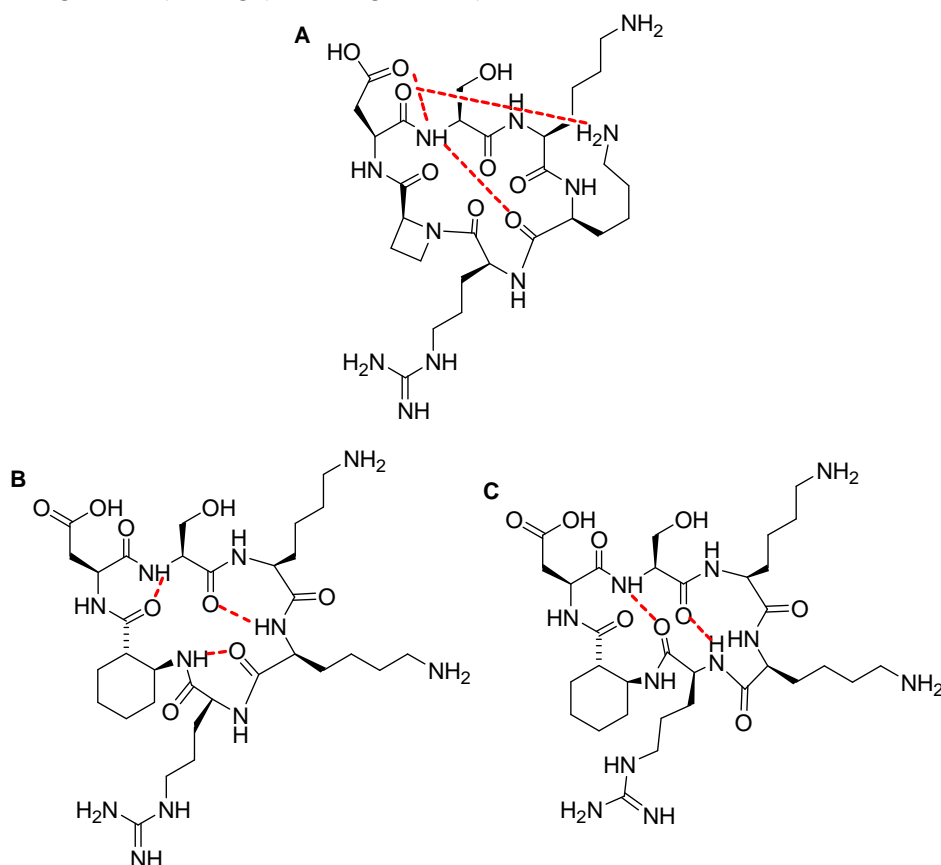
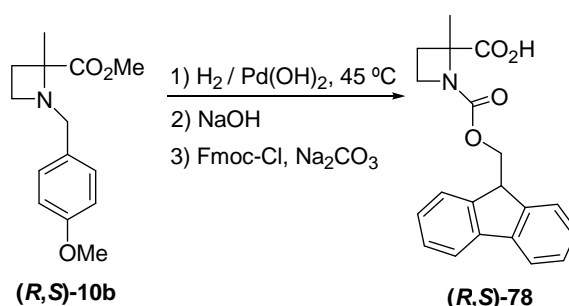


Figura 41. Representación de los enlaces de hidrógeno encontrado en los estudios de modelización molecular para los miméticos del loop 4 de BDNF.

<sup>c</sup> Esta notación indica la cadena lateral.

### 2.4.2. Síntesis.

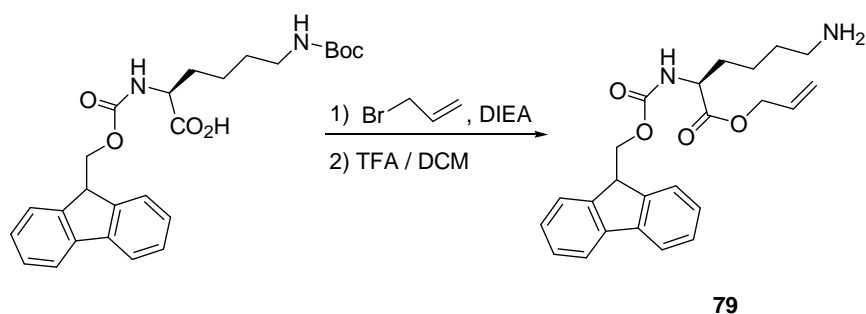
La preparación de los miméticos de los loops 2 y 4 de BDNF se realizó en fase sólida utilizando una resina Wang y una estrategia Fmoc/<sup>t</sup>Bu para la elongación de la secuencia peptídica, seguida de ciclación intramolecular con el péptido anclado a la resina. Previamente al inicio de la síntesis de miméticos de BDNF se prepararon los derivados de aminoácido no comerciales Fmoc-Aza-OH [(*R,S*)-**78**] y Fmoc-Lys-OAl (**79**), recogidos en los Esquemas 22 y 23, respectivamente. La síntesis del derivado **78** se llevó a cabo de manera sencilla mediante hidrogenación catalítica del grupo *p*-(metoxi)bencilo de la mezcla racémica (*R,S*)-**10b** utilizando Pd(OH)<sub>2</sub> como catalizador, seguida de saponificación del éster metílico, y tratamiento con Cl-Fmoc en disolución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. De esta forma se obtuvo (*R,S*)-**78** con un 57 % de rendimiento después de 3 pasos de reacción (Esquema 22). El espectro de <sup>1</sup>H RMN un doblete y triplete característicos de las señales alifáticas del grupo Fmoc junto al resto de señales aromáticas de dicho grupo, mientras que no presenta la señal del éster metílico del derivado de partida (*R,S*)-**10b**.



Esquema 22

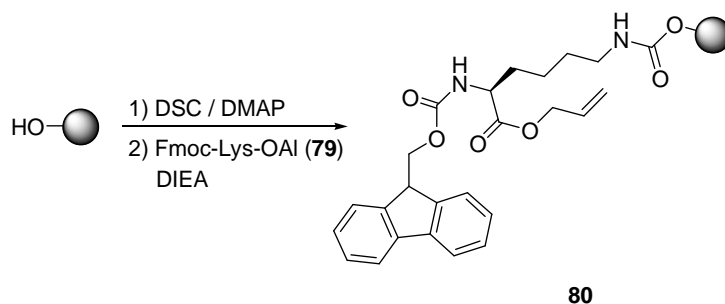
Por otra parte, la obtención del derivado ortogonalmente protegido de lisina **79** se llevó a cabo mediante reacción de Fmoc-Lys(Boc)-OH con bromuro de alilo en medio básico utilizando CH<sub>3</sub>CN como disolvente, lo que permitió la protección del ácido en posición C-terminal que no necesitó purificación posterior. La subsiguiente reacción de Fmoc-Lys(Boc)-OAl con TFA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> promovió la eliminación del grupo *tert*-butoxicarbonilo de la cadena lateral de lisina, dando lugar al derivado **79**, como se recoge en el Esquema 23. La aparición en el espectro de <sup>1</sup>H RMN de señales olefinicas en torno a 5.80-5.20 ppm, confirma la presencia del grupo alilo C-terminal, mientras que la

desaparición en los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN del singlete que integra para nueve protones, junto a los carbonos cuaternarios en torno a 157 y 80 ppm, respectivamente, indican la completa desprotección del grupo Boc.



Esquema 23

Una vez preparado el derivado de lisina **79** se procedió al anclaje de este compuesto a la resina a través de la cadena lateral (Esquema 24). Para ello, en primer lugar se activó el alcohol de la resina Wang mediante utilización de carbonato de *N*-succinimida (DSC) en medio básico bajo atmósfera inerte durante 2 h. Una vez activada la resina, se procedió al anclaje de Fmoc-Lys-OAl (**79**) utilizando DIEA como base en atmósfera de argón. Tras 4 h de reacción se obtuvo el primer aminoácido de la secuencia anclado a la resina a través de su cadena lateral (**80**, Esquema 24).

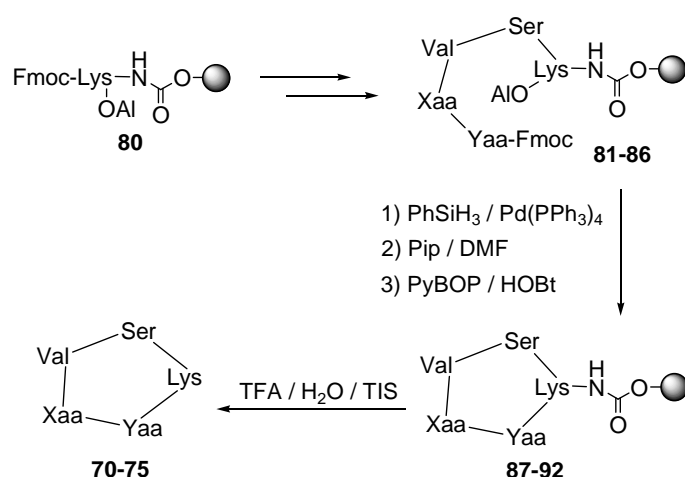


Esquema 24

A continuación se procedió a calcular el nivel de carga de la resina tras el anclaje del primer aminoácido, imprescindible para determinar el rendimiento global y necesario para calcular la cantidad de aminoácido a utilizar en las sucesivas reacciones de acoplamiento. Para este fin se emplearon 2 métodos, la cuantificación

espectrofotométrica de la cantidad de grupos Fmoc presentes en una alícuota de resina tras su liberación, y la determinación de la concentración de NHs libres de la anterior alícuota en la que se ha eliminado el grupo Fmoc, que es utilizado como método de control del anterior<sup>209</sup>. El valor de la carga de la resina obtenido mediante la utilización de los dos métodos fue similar, por lo que el valor final se calculó como la media aritmética de los resultados de ambos métodos.

La evaluación de la funcionalización de las resinas se realizó cada vez que se ancló el primer aminoácido a la resina, obteniéndose diferentes valores de carga en cada ocasión (0.24-0.54 mmol/g resina). Este hecho parece reflejar la baja reproducibilidad en la reacción de activación de la resina Wang con DSC/DMAP y/o del posterior anclaje de Fmoc-Lys-OAl (**79**), que conduce a la formación de **80**.



	70 81, 87	71 82, 88	72 83, 89	73 84, 90	(S)-74, (S)-85, (S)-91	(R)-74, (R)-85, (R)-91	(S)-75, (S)-86, (S)-92	(R)-75, (R)-86, (R)-92
Xaa	BAC <sub>6</sub> c		Azc		(S)-Aza	(R)-Aza	(S)-Aza	(R)-Aza
Yaa	Gly	β-Ala	Gly	β-Ala	Gly		β-Ala	

BAC<sub>6</sub>c= ácido (1*S*,2*S*)-2-aminociclohexanoico, Azc= (*S*)-azetidina-2-carboxilato, Aza= 2-metilazetidina-2-carboxilato.

Esquema 25

Una vez determinada la funcionalización de la resina se procedió a la síntesis de los miméticos del loop 2 de BDNF (Esquema 25). Para ello, primeramente se realizó el



acoplamiento secuencial de los aminoácidos que integran el loop mediante síntesis en fase sólida, utilizando una estrategia Fmoc/<sup>t</sup>Bu, y HBTU y DIEA como reactivos de acoplamientos, para dar lugar a los péptidos lineales **81-86**. Las reacciones de acoplamiento peptídico se monitorizaron mediante el test de ninhidrina, cuando el acoplamiento se realizó sobre aminas primarias (test de Kaiser), y el del *p*-nitrofeniléster del rojo disperso I, cuando se realizó sobre aminas secundarias. Los correspondientes test de Kaiser resultaron en general negativos, mientras que se encontraron resultados ambiguos al realizar el test de *p*-nitrofeniléster del rojo disperso I, por lo que se decidió repetir en todos los casos las reacciones de acoplamiento sobre aminas secundarias.

Una vez realizada la síntesis de los péptidos lineales se llevó a cabo la ciclación intramolecular del péptido anclado a la resina. Para ello, en primer lugar se procedió a la eliminación del grupo alilo protector del ácido carboxílico en posición C-terminal, mediante reacción con PhSiH<sub>3</sub> y Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> como catalizador, bajo atmósfera de argón. Seguidamente, se eliminó el grupo Fmoc N-terminal y se realizó la ciclación intramolecular, utilizando como reactivos de acoplamiento PyBOP, HOBT y DIEA para dar lugar a las ciclopeptidil resinas **87-92**. Tras el desanclaje de los péptidos de la resina con TFA/H<sub>2</sub>O/TIS los crudos obtenidos se analizaron mediante HPLC y espectrometría de masas. A modo de ejemplo, las Figuras 42 y 43 muestran los cromatogramas analíticos de los crudos de reacción de los derivados **70** y (*R,S*)-**75**.

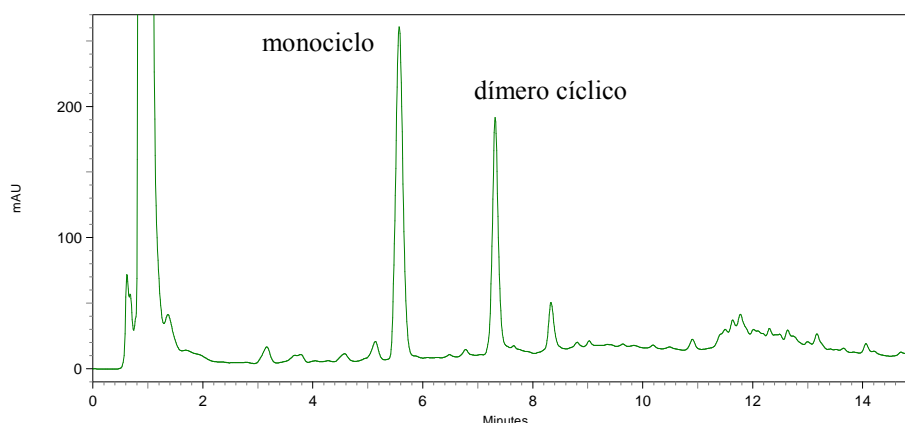


Figura 42. Cromatograma analítico del crudo de reacción del derivado **70** registrado en gradiente de 5 a 40 % de CH<sub>3</sub>CN en H<sub>2</sub>O en 15 minutos.

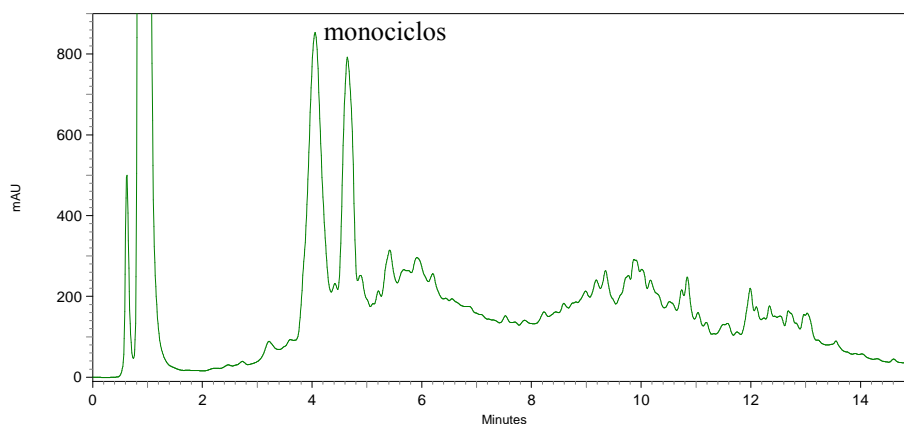
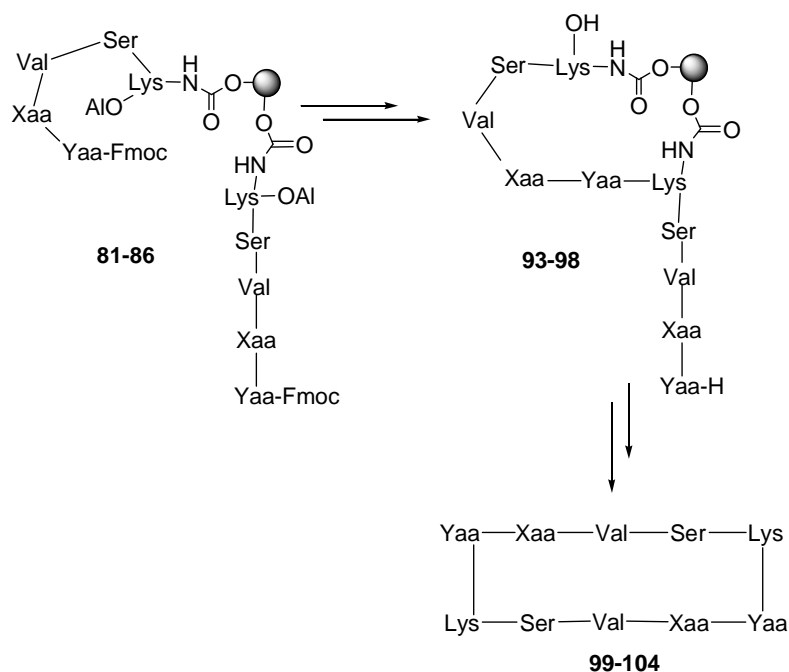


Figura 43. Cromatograma analítico del crudo de reacción de la pareja de diastereoisómeros **(R,S)-75** registrado en gradiente de 5 a 40 % de CH<sub>3</sub>CN en H<sub>2</sub>O en 15 minutos.

En los crudos de los pentapéptidos cíclicos se observa de forma general un pico mayoritario, correspondiente al ciclo buscado, y otro de menor intensidad correspondiente al dímero cíclico. Este dímero cíclico es el resultado de la condensación entre el grupo amino terminal de un monómero y el grupo carboxilato de la Lys de otro monómero vecino, y posterior ciclación intramolecular del decapeptido lineal formado (Esquema 26). Como era de esperar, los derivados que contienen un residuo de Aza [**(R,S)-75**, Figura 43] presentan crudos de reacción sensiblemente más complejos debido a que son mezcla de dos diastereoisómeros monoméricos, más los posibles dímeros cíclicos, consecuencia de la naturaleza racémica del aminoácido de partida de Aza **(R,S)-78**.



	81, 93 99	82, 94 100	83, 95 101	84, 96 102	(S)-85, (S)-97, (S)-103	(R)-85, (R)-97, (R)-103	(S)-86, (S)-98, (S)-104	(R)-86, (R)-98, (R)-104
Xaa	BAC <sub>6</sub> c		Azg		(S)-Aza	(R)-Aza	(S)-Aza	(R)-Aza
Yaa	Gly	β-Ala	Gly	β-Ala	Gly		β-Ala	

BAC<sub>6</sub>c= ácido (1*S*,2*S*)-2-aminociclohexanoico, Azg= (S)-azetidina-2-carboxilato, Aza= 2-metilazetidina-2-carboxilato.

#### Esquema 26

Los derivados **70-75**, preparados como miméticos del loop 2 de BDNF fueron purificados mediante HPLC preparativo e identificados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Tras la purificación, se encontraron purezas elevadas (85-97 %) y rendimientos variables (Tabla 21). Desafortunadamente, mientras que la pareja de diastereoisómeros de ciclo(Val-Ser-Lys-βAla-Aza) [(*R,S*)-**75**] pudo ser resuelta mediante cromatografía en HPLC preparativo y los diastereoisómeros (*R*)-**75** y (*S*)-**75** aislados individualmente<sup>d</sup>, no se pudieron separar los correspondientes diastereoisómeros de ciclo(Val-Ser-Lys-Gly-Aza) [(*R,S*)-**74**]. En ambos casos se observó que, a pesar de partir

<sup>d</sup> El compuesto (*R*)-**75** no pudo separarse cromatográficamente de uno de sus posibles dímeros cíclicos.

de un derivado de Aza racémico, se obtuvieron proporciones de diastereoisómeros de 3.3:1 para **(R,S)-74** y 1.5:1 para **(R,S)-75**, lo que indicó la existencia de resolución cinética.

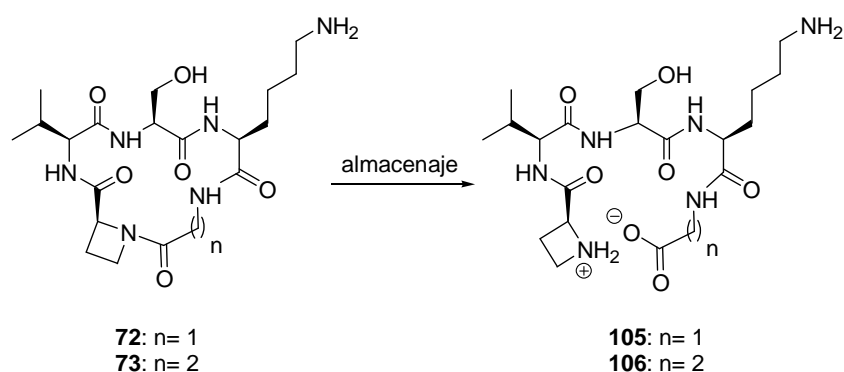
Como ya se ha indicado, en los crudos de reacción se observó junto al monómero cíclico la presencia de dímeros cíclicos, que se atribuyeron a la reacción intermolecular de dos monómeros lineales y posterior ciclación intramolecular. Cabría esperar que a mayor funcionalización de la resina, mayor densidad de péptido lineal en ella y por tanto mayor posibilidad de encontrarse dos moléculas próximas para formar un dímero. Sin embargo, y como se puede observar en la Tabla 21, aunque los derivados que contienen un residuo de Aza **(R,S)-74** y **(R,S)-75** se sintetizaron con una funcionalización de la resina menor, presentan un mayor porcentaje de dímero frente a monómero que los demás derivados. Además, los bajos porcentajes de monómero encontrado para los compuestos que poseen un residuo de 2-metil-2-carboxiazetina (en torno al 12 %) sugieren que estos derivados peptídicos presentan una conformación menos adecuada para la ciclación intramolecular del monómero, favoreciéndose por tanto la formación de dímeros. Por otra parte, no se observó correlación entre la cantidad de monómero cíclico encontrado y la presencia de Gly o  $\beta$ Ala. Así, mientras que el derivado que contiene Gly-BAc<sub>6</sub>c **70** presenta mayor porcentaje de monómero que su homólogo con  $\beta$ Ala **71**, el compuesto **73** ( $\beta$ Ala-Azg) mostró un mayor rendimiento del ciclo monomérico que el derivado que contiene Gly-Azg **72**.

Tabla 21. Porcentajes de monómeros y dímeros de los compuestos **76-81**, y carga de la resina.

Compuesto	Xaa	Yaa	% monómero	% dímero	Relación monómero:dímero	Carga de la resina
70	BAc <sub>6</sub> c	Gly	56	6	9.3:1	0.33
71		βAla	28	4	7:1	
72	Azg	Gly	17	3	5.7:1	
73		βAla	40	5	8:1	
(S)-74	Aza	Gly	10	9 <sup>a</sup>	1.4:1	0.24
(R)-74			3			
(S)-75		βAla	6	7 <sup>a</sup>	1.4:1	
(R)-75			4			

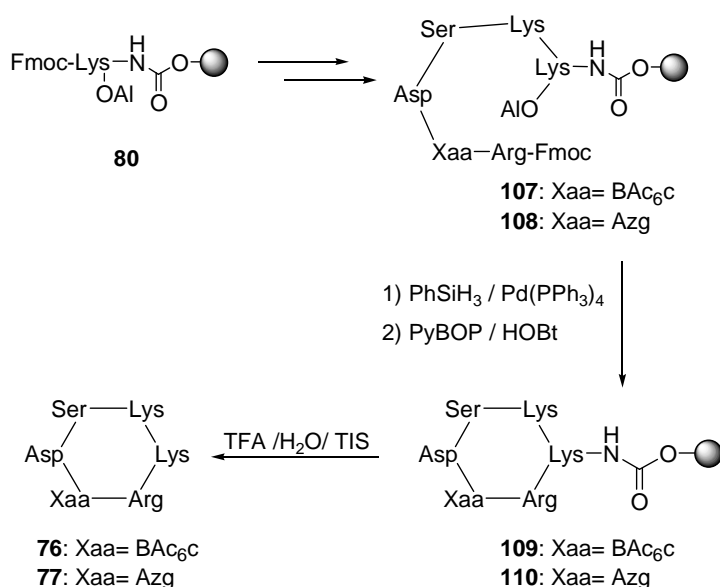
<sup>a</sup> El porcentaje incluye todos los dímeros encontrados para estos compuestos.

Es de señalar que en los estudios de espectrometría de masas MALDI-TOF se observó, junto a la presencia de monómeros y dímeros cíclicos, pequeñas cantidades de trímeros cíclicos, mientras que no se detectaron especies lineales en los crudos de reacción. Sin embargo, el análisis de los espectros de RMN de los péptidos **72** y **73** que poseen un residuo de Azg reveló la existencia de especies lineales no detectadas tras la síntesis de estos derivados. Puesto que entre la síntesis de los pentapéptidos y su estudio por RMN transcurrió un periodo de cuatro meses, las muestras almacenadas se volvieron a analizar por espectrometría de masas, observándose efectivamente la aparición en cada caso de un pico correspondiente al compuesto lineal. El análisis de los espectros de RMN mostró la presencia de señales correspondientes a protones NH en el resto de azetidina, lo que indica que estos compuestos lineales no se corresponden con los péptidos provenientes del desanclaje y desprotección de las cadenas laterales de **83** y **84**, caso de que se hubiera producido ciclación incompleta, sino que se forman por ruptura del enlace amida Xaa-Azg de los ciclos **72** y **73**, dando lugar a los derivados **105** y **106**, respectivamente (Esquema 27). Cabe destacar que el péptido lineal **105**, que incorpora un residuo de Gly, se encontró en una proporción ligeramente superior a la del ciclo buscado **72**, mientras que la especie lineal **106**, con un resto de  $\beta$ Ala, fue minoritaria (11 %) frente al análogo cíclico **73**. El hecho de que la ruptura de los ciclopentapéptidos se produzca con el paso del tiempo indica la inestabilidad de estos péptidos cíclicos. Los estudios de RMN realizados sobre nuestros derivados mostraron que los compuestos **72** y **73** presentaban un elevado porcentaje de rotámero *cis* alrededor del enlace Gly-Azg (52 y 77 %, respectivamente, Tabla 23), sensiblemente superior al del resto de derivados, lo que podría indicar que la ruptura de estos ciclopéptidos se produce a partir de dicho rotámero. Por otra parte, debido a que la ruptura del enlace Xaa-Azg se produce en mayor medida en el derivado que incorpora Gly **72** que en el de  $\beta$ Ala **73**, parece que la tensión del ciclo del derivado que contiene Gly **72** es un factor fundamental en la apertura del péptido.



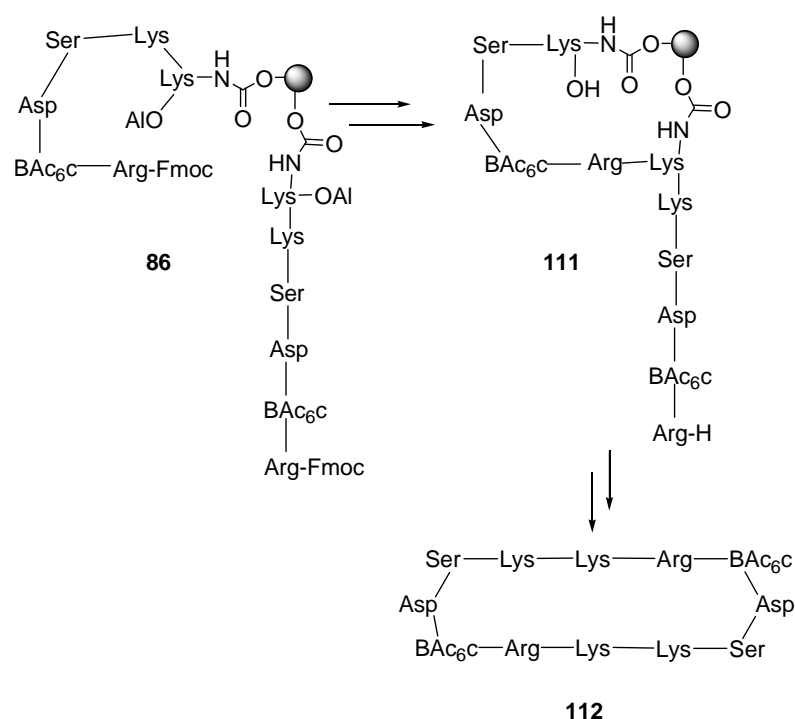
Esquema 27

Por otra parte, la síntesis de los miméticos del loop 4 **76** y **77** (Esquema 28), se realizó siguiendo una estrategia análoga a la utilizada en la síntesis de miméticos del loop 2. Para ello, en primer lugar se acopló el residuo de Fmoc-Lys-OAl (**79**) a la resina (Esquema 24). Tras determinar la funcionalización de la resina (0.54 mmol/g)<sup>209</sup>, se introdujeron secuencialmente los aminoácidos integrantes del loop 4 de BDNF. Finalmente, se procedió a la ciclación intramolecular con el péptido lineal todavía anclado a la resina, previa desprotección de los extremos *N*- y *C*-terminales.



Esquema 28

Tras purificación en HPLC preparativo, se obtuvo un bajo rendimiento de los hexapéptidos cíclicos, un 11 % para el compuesto **76**, y aún menor para el derivado que contiene Azo (77, 1 %). En la secuencia sintética que condujo a la obtención del péptido con un espaciador de BAc<sub>6</sub>C **76** se detectó también la presencia de dímero cíclico **112** (7 % de rendimiento), no observándose la presencia de compuesto lineal (Esquema 29).



Esquema 29

#### 2.4.3. Estudios de RMN.

Para estudiar la conformación en disolución de los miméticos de los loops 2 y 4 de BDNF sintetizados (compuestos **70-77**) se registraron espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN mono y bidimensionales en disolución de H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O (9:1). Además, también se registraron espectros de RMN para algunos de los dímeros cíclicos aislados, que resultaron ser menos complejos de lo esperado, debido a su simetría. Para interpretar los resultados de los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN se utilizó el programa Sparky que permite determinar con precisión señales muy próximas en desplazamiento químico. Así, primeramente se realizó la asignación de los péptidos cíclicos **70-75**, con excepción del derivado (*R*)-**75**, cuya separación cromatográfica de uno de los dímeros no fue posible, dando lugar a espectros

muy complejos. Aunque los espectros de los pentapéptidos cíclicos **72** y **73** mostraron también numerosas señales, debido a la presencia de las especies lineales **105** y **106**, respectivamente, en este caso si fue posible su asignación total.

Por otra parte, los espectros de la pareja de diastereoisómeros portadores de un residuo de Aza (**R,S**)-**74** fueron complejos, ya que se observan las señales correspondientes a los dos diastereoisómeros, junto con los respectivos rotámeros *cis/trans*. El establecimiento de los isómeros *cis/trans* correspondientes a cada diastereoisómero se realizó en base a experimentos nOe. La Figura 44 muestra el espectro NOESY de (**R,S**)-**74** a 25 °C, donde las señales nOe interresiduo de cada diastereoisómero se indican en color rojo (signo opuesto al de la diagonal), mientras que las señales correspondientes a picos de intercambio entre los protones NH de rotámeros *cis/trans* de un diastereoisómero se especifican en negro (igual signo que la diagonal). De esta manera, los picos de intercambio entre los rotámeros *cis/trans* para los NH de los residuos de Ser, Gly y Val (en negro) resultaron de utilidad para relacionar a cada diastereoisómero, con su pareja de rotámeros *cis/trans*.

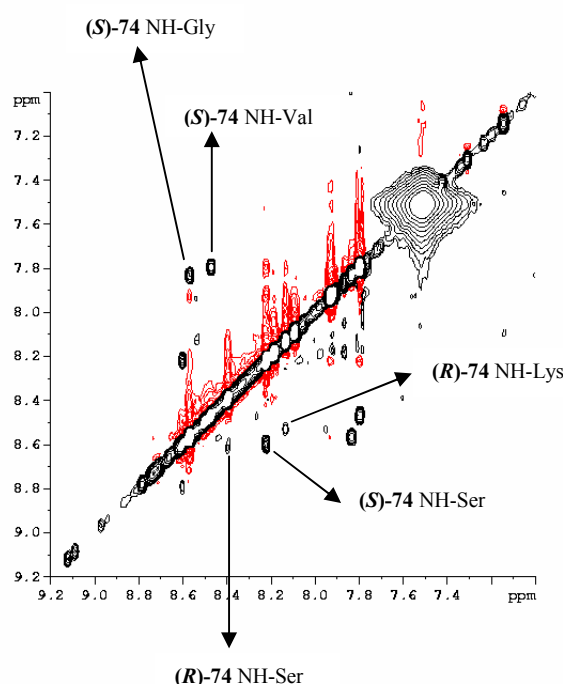


Figura 44. Ampliación de la zona de NHs del espectro NOESY de (**R,S**)-**74** a 25 °C. Las señales interresiduo se indican en color rojo, y las de intercambio en negro. Se señalan los picos nOe correspondientes a intercambio entre rotámeros *cis/trans* de un mismo diastereoisómero.



Desafortunadamente, los experimentos NOESY realizados no permitieron la asignación de la configuración absoluta en el carbono 2 del residuo de Aza de los derivados **(R,S)-74** y **(S)-75**, con residuos de Gly y  $\beta$ Ala en posición i+3, respectivamente. Esta asignación se realizó de manera tentativa mediante la comparación cuidadosa de los datos de RMN de los péptidos cíclicos que contienen Aza y los que incorporan un residuo de Azg de configuración conocida *S* (compuestos **72** y **73**). La Tabla 22 muestra los valores de desplazamiento químico de los NH amídicos, así como los protones del anillo de azetidina, para los derivados **72-75**.

Tabla 22. Valores de desplazamiento químico para los NH amídicos, y para los protones H-3 y H-4 de los derivados **72-75**<sup>a</sup>.

Comp.	Rotámero	NH-Xaa <sup>b</sup>	NH-Val	NH-Ser	NH-Lys	H-3	H-4
<b>72</b>	<i>cis</i>	7.82	9.03	8.75	7.97	2.79, 2.31	4.08, 4.01
	<i>trans</i>	8.78	7.96	8.33	8.00	2.77, 2.33	4.51, 4.37
<b>73</b>	<i>cis</i>	7.08	9.37	8.45	7.84	2.70, 2.25	4.01, 3.94
	<i>trans</i>	7.86	8.73	8.48	8.53	2.65, 2.27	4.24, 4.21
<b>(S)-74</b>	<i>(S)-cis</i>	8.04	8.62	8.68	7.95	2.58, 2.40	4.06, 3.99
	<i>(S)-trans</i>	8.75	7.89	8.33	7.97	2.51, 2.37	4.46, 4.39
<b>(R)-74</b>	<i>(R)-cis</i>	7.18	7.98	8.77	8.71	2.41	3.89
	<i>(R)-trans</i>	8.20	8.21	8.57	8.22	2.65, 2.27	4.13, 4.04
<b>(S)-75</b>	<i>(S)-cis</i>	7.50	8.78	8.66	7.95	2.54, 2.35	4.00, 3.83
	<i>(S)-trans</i>	7.88	8.40	8.48	8.64	2.51, 2.25	4.24, 4.18

<sup>a</sup>  $\delta$  en ppm <sup>b</sup> Xaa= Gly [**72**, **(R,S)-74**] o  $\beta$ Ala [**73**, **(S)-75**].

Como se recoge en la Tabla, los valores de  $\delta$  de los protones amídicos y H-4 del rotámero *trans* del compuesto que contiene Gly-Azg (**72**) son muy similares a los mostrados por el rotámero *trans* de uno de los diastereoisómeros de la mezcla **(R,S)-74**, por lo que se asignó como *S* la estereoquímica en el centro quiral del residuo de Aza de este diastereoisómero. Así, la diferencia de desplazamiento químico para los protones homólogos de **72** y **(S)-74** es siempre inferior a 0.07 ppm, mientras que los correspondientes valores del derivado **(R)-74** se encuentran en un rango de  $\pm 0.2$ -0.5 ppm con respecto al compuesto **72**. Un comportamiento paralelo se observa también para los

rotámeros *cis* de estos compuestos. De igual manera, la comparación de los desplazamientos químicos de los protones anteriormente mencionados del derivado que posee la secuencia  $\beta$ Ala-Azg **73** con el compuesto que incorpora  $\beta$ Ala-Aza [(**S**)-**75**] facilitó la asignación tentativa de la configuración del 2-C de los diastereoisómeros de **75**.

El análisis de la posible rotamería *cis/trans* de los miméticos cíclicos del loop 2 de BDNF se realizó a partir de los espectros NOESY o ROESY, observándose que los derivados que contienen Azg (**72** y **73**) y Aza [(**R,S**)-**74** y (**S**)-**75**] presentan dicha rotamería. Los rotámeros mayoritarios de ciclo(Xaa-Azg-Val-Ser-Lys) (**72**, Xaa= Gly; **73**, Xaa=  $\beta$ Ala) se asignaron como *cis* gracias al pico de cruce observado entre el protón  $\alpha$  del residuo de Xaa (Xaa= Gly,  $\beta$ Ala) y el protón H-2 del anillo de azetidina. Por el contrario, los isómeros mayoritarios de los derivados (**R,S**)-**74** y (**S**)-**75** portadores de un residuo de Aza, fueron asignados como *trans* al observarse señales nOe entre el protón  $\alpha$  de Gly/ $\beta$ Ala y los H-4 del anillo de azetidina. Además, la asignación de rotámeros está de acuerdo con los criterios de anisotropía indicados en el capítulo anterior de esta Tesis.

Los datos de la Tabla 23 muestran que, como cabría esperar<sup>134,136</sup>, existe un incremento de isómero *trans* cuando se produce disustitución en el carbono 2 del anillo de azetidina. Así, por ejemplo, el derivado **72** con un residuo de Azg presenta un 52 % de rotámero *cis* frente a (**R**)-**74** y (**S**)-**74** con un resto de Aza, con 17 y 10 %, respectivamente, o el mimético portador de la secuencia  $\beta$ Ala-Azg **73**, 77 % de isómero *cis*, frente al que contiene  $\beta$ Ala-Aza (**S**)-**75** con un 43 %. Es de señalar la influencia del residuo de  $\beta$ Ala en la proporción de isómeros *cis/trans*, ya que supone un incremento de más del 30 % del rotámero *cis* con respecto a los análogos con Gly. En particular, cabe destacar el alto porcentaje de isómero *cis* encontrado para el péptido cíclico que incorpora  $\beta$ Ala-Azg (**73**, 77 %). Si se comparan los porcentajes de isomería *cis/trans* encontrados experimentalmente con los obtenidos en los estudios de modelización molecular, se observa que no existe correlación entre ellos. Así, en los estudios teóricos sólo se observa rotámero *cis* en los derivados que incorporan Gly **72** (83 %) y (**R**)-**74** (22 %), mientras que por RMN la presencia de este rotámero se incrementa cuando el aminoácido Gly se sustituye por  $\beta$ Ala.

Tabla 23. Porcentaje de rotámero *cis* para los miméticos del loop 2 de BDNF **72-75**.

Compuesto		% <i>Cis</i>
ciclo(Val-Ser-Lys-Gly-Azg)	<b>72</b>	52
ciclo(Val-Ser-Lys-βAla-Azg)	<b>73</b>	77
ciclo[Val-Ser-Lys-Gly-( <i>S</i> )-Aza]	<b>(S)-74</b>	10
ciclo[Val-Ser-Lys-Gly-( <i>R</i> )-Aza]	<b>(R)-74</b>	17
ciclo[Val-Ser-Lys-βAla-( <i>S</i> )-Aza]	<b>(S)-75</b>	43

Por otra parte, con objeto de obtener información de los posibles enlaces de hidrógeno de los protones amídicos de estos compuestos, se realizaron estudios de la variación del desplazamiento químico de dichos protones con la temperatura en H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O (9:1)<sup>210-212</sup>. Valores de coeficientes de temperatura en H<sub>2</sub>O iguales o inferiores a 4 ppb/K (en valor absoluto) indican que el protón NH está protegido del disolvente, lo que sugiere la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular. Por el contrario, valores superiores a 5 ppb/K muestran accesibilidad del disolvente al NH, descartando la existencia de este tipo de enlace. Finalmente, valores de estos coeficientes entre 4-5 ppb/K no son concluyentes. En la Tabla 24 se encuentran recogidos los valores de los coeficientes de temperatura de los pentapéptidos cíclicos **70-75**, y de los péptidos lineales **105** y **106**. Como se observa en la Tabla, ninguno de los NH amídicos de los compuestos lineales muestra valores de  $\Delta\delta/\Delta T$  que indiquen la presencia de enlaces de hidrógeno. Por otra parte, los NH amida de los péptidos cíclicos cuyo espaciador es BAc<sub>6</sub>c están expuestos en general al disolvente, con la única excepción del protón amídico del residuo de βAla en el derivado **71**. Este enlace de hidrógeno en el que participa el NH del residuo de βAla se observa también en los rotámeros *cis* de los compuestos **73**, **(R)-74**, **(S)-75** y **(R)-75**.

El mimético que incorpora βAla-BAc<sub>6</sub>c **71** tiene valores de coeficiente de temperatura para el NH-βAla compatibles con la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular, mientras que el protón amida análogo del derivado con Gly **70** muestra un valor que está en zona de incertidumbre. Estos datos correlacionan bien con los de modelización, donde se observó que al sustituir Gly por βAla aumentó el número de conformeros con un giro β estabilizado por enlace de hidrógeno entre CO-Val...NH-Gly/βAla.

Analizando conjuntamente los rotámeros *cis* de los compuestos **72-75** se puede comprobar que existe tendencia a la formación de enlaces de hidrógeno en los que está implicado el protón NH del residuo de Lys, con excepción del derivado que incorpora un residuo de Aza (**(R)**-**74**), y sin datos sobre este protón en el compuesto (**(R)**-**75**). Además, los rotámeros *cis* de los derivados **73**, (**(R)**-**74**), (**(R)**-**75**) y (**(S)**-**75**) presentan un enlace de hidrógeno en el que participa el  $\text{NH}^{\text{H}^+3}$ , con independencia de que este aminoácido sea Gly o  $\beta\text{Ala}$ . Por otra parte, los rotámeros minoritarios *cis* de los derivados (**(S)**-**74**) y (**(R)**-**75**) muestran protección adicional del NH-Ser o del NH-Val, respectivamente.

Si se analizan los coeficientes de temperatura para los conformeros *trans* de los derivados **72-75**, se observa que para los péptidos que incorporan un residuo de Gly [**72**, (**(R)**-**74**) y (**(S)**-**74**)] existe tendencia a la formación de un enlace de hidrógeno en el que participa el NH del residuo de Lys, mientras que este protón está expuesto en los análogos que poseen un residuo de  $\beta\text{Ala}$  [**73**, (**(R)**-**75**) y (**(S)**-**75**)]. Este distinto patrón de enlace de hidrógeno nos indica que la disposición 3D global de los ciclopentapéptidos que incorporan Gly o  $\beta\text{Ala}$  es distinta. En los estudios de modelización molecular se observó la existencia de un enlace de hidrógeno entre el NH del residuo de Lys y el CO-Val, que se corresponde con un giro  $\gamma$ . Por otra parte, el rotámero *trans* de los derivados **72**, (**(R)**-**74**) y (**(R)**-**75**) presenta valores de coeficiente de temperatura para el NH-Val que indican la participación de este protón en un enlace de H intramolecular. Los estudios teóricos sugieren que el carbonilo implicado en este enlace es el del residuo de Gly o  $\beta\text{Ala}$ , y por tanto se correlaciona con el giro  $\gamma$  inducido por el residuo de Azx.

Los estudios teóricos llevados a cabo para la pareja de diastereoisómeros (**(R)**-**74**) y (**(S)**-**74**), así como para (**(R)**-**75**) y (**(S)**-**75**), indicaron que los péptidos que muestran configuración *R* en el anillo de Aza poseen un enlace de hidrógeno entre  $\text{CO-}\beta\text{Ala}\cdots\text{NH-Val}$ , mientras que este enlace no existe o su porcentaje es muy inferior en los compuestos de configuración *S*. Como se ha comentado anteriormente, los estudios de RMN han mostrado que solamente los derivados asignados tentativamente como (**(R)**-**74**) y (**(R)**-**75**) tienen protegido el NH del residuo de valina para el rotámero *trans*, y (**(R)**-**75**) también para el *cis*, por lo que los estudios de modelización molecular apoyan la asignación tentativa de la configuración en el 2-C del residuo de Aza.

Tabla 24. Coeficientes de temperatura para los protones NH de los rotámeros *cis* y *trans* de los miméticos del loop 2 de BDNF.

Comp.	Rot.	Xaa	Yaa	$\Delta\delta/\Delta T^a$				
				NH-Val	NH-Ser	NH-Lys	NH-Gly/ $\beta$ Ala	NH-Xaa
<b>70</b>	<i>trans</i>	BAc <sub>6</sub> c	Gly	-7.5	-5.5	-6.5	<b>-5.0</b>	-6.0
<b>71</b>	<i>trans</i>		$\beta$ Ala	-6.5	-8.5	-7.5	<b>-2.5</b>	-8.0
<b>72</b>	<i>cis</i>	Azg	Gly	-7.0	-5.5	<b>-3.0</b>	-8.0	
	<i>trans</i>			<b>-4.0</b>	-5.5	<b>-2.0</b>	-8.5	
<b>73</b>	<i>cis</i>		$\beta$ Ala	-10.0	-6.5	<b>-0.5</b>	<b>-1.0</b>	
	<i>trans</i>			-7.5	<b>-4.5</b>	<b>-5.0</b>	<b>-5.0</b>	
<b>(S)-74</b>	<i>cis</i>	Aza	Gly	-7.0	<b>-3.5</b>	<b>-2.0</b>	-10.0	
	<i>trans</i>			<b>-4.5</b>	<b>-5.0</b>	<b>-2.0</b>	-8.5	
<b>(R)-74</b>	<i>cis</i>			-5.5	-7.0	-8.0	<b>-2.0</b>	
	<i>trans</i>			<b>-1.0</b>	-8.5	<b>-4.0</b>	<b>-5.0</b>	
<b>(S)-75</b>	<i>cis</i>		$\beta$ Ala	-8.0	-7.0	<b>-2.5</b>	<b>-2.0</b>	
	<i>trans</i>			-7.5	<b>-4.5</b>	-7.0	<b>-5.0</b>	
<b>(R)-75</b>	<i>cis</i> <sup>b</sup>			<b>-0.8</b>	-10.0	<i>nd</i>	<b>-2.9</b>	
	<i>trans</i>			<b>-1.1</b>	-9.8	-9.6	-6.0	
<b>105</b>		Azg	Gly	-6.0	-9.0	-9.5	-7.5	
<b>106</b>			$\beta$ Ala	-6.0	-9.0	-10.5	-7.0	

<sup>a</sup> Valores en ppb/K.  $\Delta\delta$  medido en H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O a 5 y 25 °C. <sup>b</sup> Aunque no fue posible asignar todas las señales del diastereoisómero **(R)-75**, sí fue posible la asignación tentativa de sus protones amídicos, con excepción del NH-Lys.

Finalmente, en cuanto a los miméticos del loop 4 de BDNF, solamente se realizaron estudios conformacionales y de temperatura para el derivado **76** [ciclo(Asp-Ser-Lys-Lys-Arg-BAc<sub>6</sub>c)], debido al bajo rendimiento obtenido para el compuesto **77**, que contiene un residuo de Azg como espaciador del loop. Cabe recordar que en el loop 4 de BDNF nativo existen enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los protones NH de los residuos de Lys3 y Arg con el oxígeno carbonílico de la cadena lateral de Asp. Los estudios de temperatura realizados sobre el compuesto **76** (Tabla 25) muestran que dos de sus protones amídicos están formando parte de un enlace de hidrógeno intramolecular, NH-Ser y NH-Arg. Además, existe la posibilidad de que los NH del residuo de BAc<sub>6</sub>c y de Lys4 no se encuentren expuestos al disolvente, aunque no se puede establecer de forma inequívoca al estar sus coeficientes de temperatura en la

zona de incertidumbre. Si comparamos estos datos experimentales con los teóricos, se observa una buena correlación entre ellos, ya que los estudios de modelación molecular predecían posibles enlaces de hidrógeno entre CO-Ser...NH-Arg y del NH-Ser con los carbonilos de Arg o BAc<sub>6</sub>c.

Tabla 25. Coeficientes de temperatura para los protones NH de los miméticos del loop 4 de BDNF.

Compuesto	$\Delta\delta/\Delta T^a$					
	Asp	Ser	Lys3	Lys4	Arg	BAc <sub>6</sub> c
ciclo(Asp-Ser-Lys-Lys-Arg-BAc <sub>6</sub> c) 76	-8.5	-3.0	-6.5	-5.0	-3.5	-4.5

<sup>a</sup> Valores en ppb/K.  $\Delta\delta$  medido en H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O a 5 y 25 °C.

Con el fin de profundizar en la disposición 3D de estos miméticos, se analizaron los experimentos NOESY y ROESY para obtener información de protones no secuenciales próximos en el espacio. Desafortunadamente, no se obtuvieron nOes que permitieran calcular su estructura 3D. Por lo tanto, la única información acerca de la estructura tridimensional de estos miméticos es la proporcionada por los estudios de temperatura, que combinados con los datos de modelización molecular sugieren que en estos péptidos cíclicos, al igual que en los loops nativos, no se observa el enlace de hidrógeno característico de los giros  $\beta$ . Por otra parte, en los miméticos diseñados existe protección al disolvente de diferentes protones amídicos, que de acuerdo con los estudios de modelización se corresponderían fundamentalmente con giros  $\gamma$ . Los estudios teóricos también sugieren que la existencia de estos giros  $\gamma$  es compatible con una disposición global de estos péptidos cíclicos similar a la de los loop nativos. Por otra parte, señalar que en algunos derivados, en concreto **72**, (**R**)-**74** y (**R**)-**75**, se observa también la existencia de conformaciones en las que está presente el giro  $\gamma$  inducido por los derivados de 2-metil-2-carboxiazetidina (Aza).

Además de los estudios de RMN llevados a cabo con los monómeros cíclicos **70-75**, se analizaron también los espectros de los dímeros aislados. En concreto se escogieron aquellos dímeros que estuvieran en cantidad y pureza adecuadas, y que se corresponden a la secuencia del loop 2, ciclo(Val-Ser-Lys- $\beta$ Ala-BAc<sub>6</sub>c)<sub>2</sub> (**100**) y ciclo(Val-Ser-Lys-Gly-Aza)<sub>2</sub> (**103a**), y un dímero del loop 4, ciclo(Asp-Ser-Lys-Lys-Arg-BAc<sub>6</sub>c)<sub>2</sub> (**112**). Se registraron experimentos NOESY y ROESY para determinar su estructura 3D en los que, contrariamente a lo observado para los monómeros, se

encontraron un buen número de señales nOe interresiduo. Desafortunadamente, la simetría de estos compuestos hizo difícil la interpretación de las señales nOe observadas. Un problema añadido en la asignación de los dímeros que incorporan Aza proviene de la naturaleza racémica del residuo de 2-metil-2-carboxiazetidina de partida. Así, los dímeros **103a** y **103b** podrían ser *SS*, *RR* o *RS* (*RS=SR*), dependiendo de la configuración absoluta de los derivados de 2-metil-2-carboxiazetidina que componen los dímeros.

Las Tablas 26 y 27 muestran los coeficientes de temperatura para los rotámeros mayoritarios de estos dímeros cíclicos. Como se observa en la Tabla 26, el dímero que contiene los residuos de  $\beta$ Ala-BAC<sub>6</sub>c **100** no presenta protección en ninguno de sus NH amídicos, mientras que el portador de un residuo de 2-metil-2-carboxiazetidina **103a**, muestra un fuerte enlace de hidrógeno en el que participa el NH del residuo de Val ( $\delta\Delta/\Delta T = -0.0$ ). Si se comparan los  $\delta\Delta/\Delta T$  del dímero cíclico **100** y su correspondiente análogo monomérico **71** se observa que el compuesto **71**, a diferencia de **100**, presenta un enlace de hidrógeno en el que está implicado el NH- $\beta$ Ala, lo que indica que la disposición tridimensional global de cada monómero dentro del dímero es diferente a la del monómero cíclico. Por otra parte, la comparación del dímero **103** es más compleja al no conocerse la estereoquímica en el anillo de azetidina. Sin embargo, el enlace de hidrógeno presente en este dímero tan sólo se observa para el derivado (*R*)-**74** en el rotámero *trans*, con lo que esto podría ser indicativo de que la configuración de los residuos de Aza en el dímero es *R*, o bien de una disposición global del dímero diferente a la del monómero.

Tabla 26. Coeficientes de temperatura para los protones NH de los rotámeros mayoritarios de los dímeros del loop 2 de BDNF.

Compuesto		$\Delta\delta/\Delta T^a$				
		NH-Val	NH-Ser	NH-Lys	NH-Gly/ $\beta$ Ala	NH-Xaa
ciclo(Val-Ser-Lys- $\beta$ Ala-BAC <sub>6</sub> c) <sub>2</sub>	<b>100</b>	-9.0	-5.5	-8.0	-7.5	-7.5
ciclo(Val-Ser-Lys- $\beta$ Ala-BAC <sub>6</sub> c)	<b>71</b>	-6.5	-8.5	-7.5	<b>-2.5</b>	-8.0
ciclo(Val-Ser-Lys-Gly-Aza) <sub>2</sub>	<b>103a</b>	<b>-0.0</b>	-9.0	-6.5	-10.0	-
ciclo(Val-Ser-Lys-Gly-( <i>R</i> )-Aza)	( <i>R</i> )- <b>74</b> <sup>b</sup>	<b>-1.0</b>	-8.5	<b>-4.0</b>	<b>-5.0</b>	-

<sup>a</sup> Valores en ppb/K.  $\Delta\delta$  medido en H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O a 5 y 25 °C. <sup>b</sup> Rotámero *trans*.

La Tabla 27 muestra los coeficientes de temperatura del dímero cíclico derivado del loop 4 que incorpora un grupo BAC<sub>6</sub>c (**112**) como espaciador, junto a los de su

correspondiente monómero cíclico (**76**). Los coeficientes de temperatura indican que únicamente el NH-Lys4 está implicado en enlace de H intramolecular. Estos coeficientes de temperatura del dímero **112** son muy distintos a los de su correspondiente monómero **76**, donde los NH de Ser y Arg se encontraban protegidos al disolvente.

Tabla 27. Coeficientes de temperatura para los protones NH del dímero **112**.

Compuesto	$\delta\Delta/\Delta T^a$					
	Asp	Ser	Lys3	Lys4	Arg	BAC <sub>6</sub> c
ciclo(Asp-Ser-Lys-Lys-Arg-BAC <sub>6</sub> c) <sub>2</sub> <b>112</b>	-7.0	-5.0	-6.5	-2.5	-8.0	-8.5
ciclo(Asp-Ser-Lys-Lys-Arg-BAC <sub>6</sub> c) <b>76</b>	-8.5	-3.0	-6.5	-5.0	-3.5	-4.5

<sup>a</sup> Valores en ppb/K.  $\Delta\delta$  medido en H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O a 5 y 25 °C.

#### 2.4.4. Estudios biológicos.

Los miméticos de los loops 2 y 4 de BDNF fueron evaluados en el Weill Medical College de la Universidad de Cornell por el equipo del Dr. S. Jaffrey. Para evaluar la actividad de estos péptidos, se estudió su capacidad para inducir la fosforilación de los receptores TrkB, caso de comportarse como agonistas, o para inhibir la fosforilación de los mismos inducida por BDNF, caso de antagonistas. Estos estudios, que se han llevado a cabo a partir de cultivos de neuronas de hipocampo, se han realizado con los análogos cíclicos **70-76**, y los dímeros cíclicos **99-103** y **112**, a una concentración de 100  $\mu$ M. Los ensayos en ausencia de BDNF, han demostrado que estos péptidos son incapaces de inducir la fosforilación de los receptores TrkB y que, por lo tanto, no se comportan como agonistas. Por otra parte, los estudios en los que se han incubado las células previamente con el péptido en estudio y después con BDNF (Figura 45) indican que, en general, los monómeros cíclicos son inactivos, con la excepción del mimético del loop 4 de BDNF **76** [ciclo(Asp-Ser-Lys-Lys-Arg-BAC<sub>6</sub>c)], que es capaz de causar una inhibición significativa de la fosforilación inducida por BDNF. Este resultado indica que este compuesto se comporta como antagonista de los receptores TrkB. La capacidad inhibitoria de este mimético se podría atribuir a que la conformación 3D del péptido cíclico **76** sea similar a la del fragmento nativo. Desafortunadamente, los estudios de RMN no han proporcionado información suficiente que permita confirmar este punto. Adicionalmente, dos de los dímeros ensayados (los compuestos **103b** y **112**) han promovido también la inhibición de la fosforilación inducida por BDNF. El hecho de que el dímero del loop 2 **103b**



[ciclo(Val-Ser-Lys-Gly-Aza)<sub>2</sub>] haya mostrado actividad, mientras que el correspondiente monómero **(R)-74** o **(S)-74** sea inactivo, podría ser debido a la mayor flexibilidad conformacional del dímero, que le permitiría adaptarse al sitio de unión mediante un mecanismo de inducción. Por otra parte, el compuesto **(R)-75** también ha mostrado cierta actividad antagonista. Teniendo en cuenta que este compuesto está impurificado por su correspondiente dímero, se podría atribuir su actividad al dímero presente en la mezcla. Es de señalar, que a pesar de ser estructuras diméricas no se comportan como agonistas, como se había observado en otros miméticos diméricos de estos loops<sup>197,200,201</sup>.

En conjunto, los resultados de los estudios biológicos han proporcionado tres derivados que se pueden considerar como un buen punto de partida para el estudio de nuevos miméticos de estas estructuras. En relación a los análogos del loop 2, se puede argumentar que la conformación global de los monómeros cíclicos no es adecuada para su interacción con los receptores TrkB, y que probablemente un aumento de la flexibilidad conformacional nos conduzca a estructuras con mejores propiedades. Para este fin, se podrían evaluar nuevos espaciadores que permitan a los aminoácidos integrantes del loop 2 adoptar una disposición 3D similar a la del péptido nativo. Por otra parte, los resultados obtenidos han sido más prometedores para los miméticos del loop 4. En principio, el derivado **76** sería un buen candidato como punto de partida en la búsqueda de nuevos compuestos con mejores propiedades, y en los que se fuera reduciendo progresivamente el carácter peptídico.

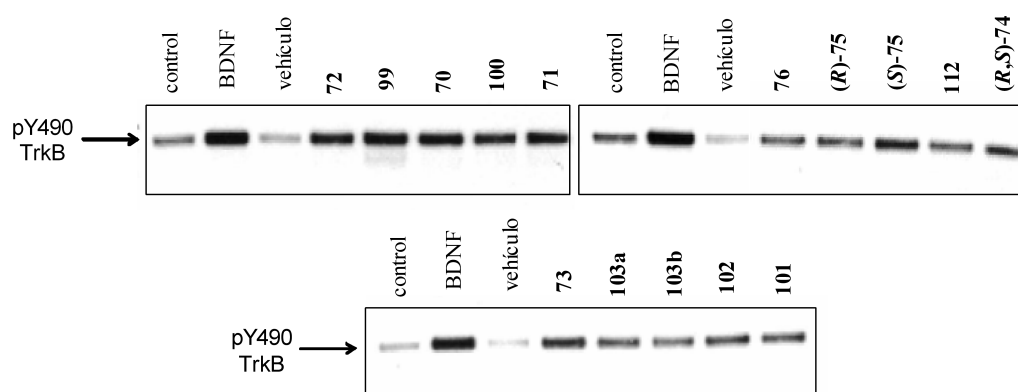


Figura 45. Estudio de la inhibición de la fosforilación de TrkB inducida por BDNF, mediante el análisis por Western Blot de lisados celulares.



## 2.5. Conclusiones.

En base a la importancia de una serie de giros inversos localizados en la superficie de las neurotrofinas, se abordó el diseño, síntesis y evaluación biológica de una serie de análogos restringidos de estos giros. Utilizando como patrón los loops 1 y 4 de NGF se han desarrollado una serie de análogos lineales, y a partir de los loops 2 y 4 de BDNF se han diseñado diferentes análogos cíclicos. Los resultados más relevantes de este capítulo se resumen en las siguientes conclusiones:

1. La incorporación de los derivados de 2-carboxiazetidinas en los fragmentos correspondientes a giros  $\beta$  de NGF ha conducido a péptidos que adoptan estructuras de giros  $\gamma$ . Se ha observado que, al igual que en los modelos tetrapeptídicos simplificados, la disustitución sobre el carbono 2 del anillo de azetidina es un factor importante para la inducción de estos giros.
2. En los péptidos cíclicos diseñados como miméticos de BDNF, que imponen una mayor restricción conformacional sobre los aminoácidos que los integran, también se ha observado en algunos derivados la existencia del giro  $\gamma$  inducido por los residuos de 2-carboxiazetidina.
3. La capacidad inductora de giros  $\gamma$  de las 2-carboxiazetidinas observada en estos péptidos ha reforzado la validez de estos aminoácidos conformacionalmente restringidos como inductores de giros  $\gamma$ , y por lo tanto, su utilidad general para forzar la adopción de esta estructura secundaria cuando se incorporen a péptidos de interés.
4. Los ensayos biológicos de los miméticos de BDNF han mostrado que los derivados **76**, **103b** y **112** son capaces de antagonizar la fosforilación del receptor TrkB inducida por BDNF, constituyendo cabezas de serie interesantes para su optimización.



## 2.6. Parte experimental.

*Generalidades:* Los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN de los productos de partida así como los de los análogos de NGF se registraron en un espectrómetro Varian UNITY 500 (500 MHz), Varian INOVA 400 (400 MHz), Varian INOVA-300 (300 MHz) o Bruker 300 (300 MHz), utilizando TMS como referencia interna. Los espectros de RMN de los miméticos de BDNF se registraron en un espectrómetro Bruker AV 600 (600 MHz) equipado con una criosonda con gradientes Z, utilizando TMS como referencia interna. Los espectros de masas de los productos de partida así como los de los análogos de NGF (Electrospray, modo positivo) se registraron en un espectrómetro Hewlett-Packard 1100SD, mientras que los espectros de masas de los miméticos de BDNF (MALDI-TOF) se registraron en un espectrómetro Voyager DE-STR, utilizando como matrices ACH (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico) o DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico), según el caso.

Los HPLC analíticos de los productos de partida así como los de los análogos de NGF [excepto **(R,S)-53**] se realizaron en un aparato Waters, utilizando la columna de fase reversa Novapack  $\text{C}_{18}$  (3.9 x 150 mm, 4 $\mu\text{M}$ ). La fase móvil empleada y referida como A:B corresponde a mezclas  $\text{CH}_3\text{CN(A)}/\text{H}_2\text{O}$  (0.05% TFA)(B) y el gradiente es de 30 min. En todos los casos el flujo fue de 1 mL/min y la detección de picos se realizó por UV a 214 nm.

Los cromatogramas de la pareja de diastereoisómeros **(R,S)-53** se registraron en un aparato Waters, integrado por un bomba Delta 600, un detector de absorbancia dual 2487, y un colector de fracciones Fraction Collector III. La cromatografía se realizó en fase reversa utilizando una columna ACE 5  $\text{C}_{18}$ -300 (4.6 mm x 250 mm, analítico; 10 mm x 250 mm, semipreparativo). La muestra se analizó y purificó utilizando gradientes lineales durante 30 min a un flujo de 1.3 mL/min (analítico) o 6 mL/min (semipreparativo), con una detección en continuo a 214 y 256 nm y gradiente de 75 min.

Los HPLC analíticos de los miméticos de BDNF se realizaron en un aparato Shimadzu LC-2010-A, utilizando columnas de fase reversa Phenomenex Luna 3u  $\text{C}_{18}$  (2) (50 x 4.60 mm, 3 $\mu\text{M}$ ) y Phenomenex Luna 3u  $\text{C}_8$  (2) (50 x 4.60 mm, 3 $\mu\text{M}$ ). La fase móvil empleada y referida como A:B corresponde a mezclas  $\text{CH}_3\text{CN(A)}/\text{H}_2\text{O(B)}$  con un 0.036 % de TFA en  $\text{CH}_3\text{CN}$  y 0.045 % de TFA en  $\text{H}_2\text{O}$ . En todos los casos el flujo fue de 1 mL/min y la

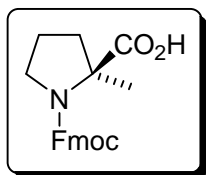
detección de picos se realizó por UV a 220 nm. Las separaciones cromatográficas en HPLC preparativo se realizaron utilizando un aparato Shimadzu con bombas LC-8A, un detector SPD-10A y un controlador SCL-10A. Para ello se utilizaron columnas de fase reversa Luna 10u C<sub>18</sub> 100A (250 x 21.20 mm, 10μM), Luna 10u C<sub>8</sub> 100A (250 x 21.20 mm, 10μM) y Luna 10u C<sub>8</sub> (2) (250 x 10.00 mm, 10μM). La fase móvil empleada y referida como A:B corresponde a mezclas CH<sub>3</sub>CN(A)/H<sub>2</sub>O(B) con un 0.1 % de TFA en CH<sub>3</sub>CN y en H<sub>2</sub>O. Para las dos primeras columnas (Luna 10u C<sub>18</sub> 100A y Luna 10u C<sub>8</sub> 100A, columnas preparativas) el flujo fue de 25mL/min, mientras que para la tercera columna (Luna 10u C<sub>8</sub> (2), columna semipreparativa) el flujo fue de 5mL/min. La detección de picos se realizó por UV a 220 nm en todos los casos en gradientes de 25 min.

Los poderes rotatorios se determinaron en un polarímetro Perkin Elmer 141. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Reichert-Jung Kofler y están sin corregir.

Los compuestos Pmb-Lys(Boc)-OMe (**56b**), Pmb-Glu(O<sup>t</sup>Bu)-OMe (**56c**), *N*-cloroacetyl-*N*-(*p*-metoxi)bencil-Lys(Boc)-OMe (**57b**), *N*-cloroacetyl-*N*-(*p*-metoxi)bencil-Glu(O<sup>t</sup>Bu)-OMe (**57c**), (*R,S*)-1-(*p*-metoxi)bencil-4-[3-(*tert*-butoxicarbonil)amino]butil-4-metoxycarbonil-2-azetidinona [(*R,S*)-**58b**], (*R,S*)-1-(*p*-metoxi)bencil-4-metoxycarbonil-4-(*tert*-butoxicarbonil)etil-2-azetidinona [(*R,S*)-**58c**], Pmb-(*R,S*)-Azk(Boc)-OMe [(*R,S*)-**59b**] y Fmoc-Lys-OAl (**77**) ya se han descrito previamente<sup>85,106,160,212</sup>.

### 2.6.1. Preparación de productos de partida en disolución.

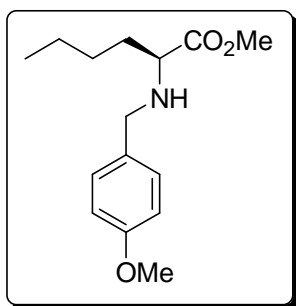
#### Síntesis de Fmoc-α-MePro-OH (**55**):



A una disolución de H-α-MePro-OH (100 mg, 0.77 mmol) en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aq (10%)/dioxano (1.5 mL/1.5 mL) a 0 °C se añade Fmoc-Cl (199.2 mg, 0.77 mmol) disuelto en dioxano (1.5 mL) y se mantiene la temperatura de reacción a 0 °C durante 1 h. Tras 3 h de reacción a temperatura ambiente se añade H<sub>2</sub>O y se lava el crudo con Et<sub>2</sub>O. Posteriormente, se acidifica la fase acuosa mediante adición de HCl 1M hasta pH=2 y se extrae el producto con AcOEt. La fase orgánica se lava con H<sub>2</sub>O y se

seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se evapora el disolvente a sequedad y se purifica el residuo en columna de gel de sílice, utilizando 2 % de MeOH en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como sistema de eluyentes. De esta forma se obtiene el compuesto **55** (255 mg, 94 %) en forma de sirupe. HPLC:  $t_R$ = 3.72 min. (A:B=50:50).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.82-7.30 (m, 8H, Ph), 4.48 (d, 2H,  $J$ =7.2,  $\text{CH}_2$ -Fmoc), 4.29 (t, 1H,  $J$ =7.2, CH-Fmoc), 3.60 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 2.48 (m, 1H,  $\beta$ -H, Pro), 1.97-1.82 (m, 3H,  $\beta$ -H, Pro,  $\gamma$ -H, Pro), 1.66 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ - $\alpha$ Pro).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  178.3 (CO- $\alpha$ Pro), 154.8 (CO-Fmoc), 144.1, 141.2 (C-Ph), 127.6, 127.0, 125.1, 119.9 (CH-Ph), 67.0 ( $\text{CH}_2$ -Fmoc), 65.8 ( $\alpha$ -C, Pro), 47.9 ( $\delta$ -C, Pro), 47.2 (CH-Fmoc), 39.0 ( $\beta$ -C, Pro), 23.1 ( $\gamma$ -C, Pro), 21.9 ( $\text{CH}_3$ - $\alpha$ Pro). EM (ES modo positivo): 352.1  $[\text{M}+1]^+$ , 375.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 725.3  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ : C, 71.78; H, 6.02; N, 3.99. Anal. Exp. (%): C, 71.54; H, 6.23; N, 4.08.

#### Síntesis de Pmb-Nle-OMe (**56a**).

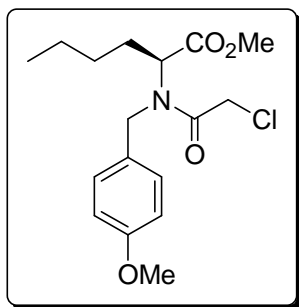


Se disuelve H-Nle-OMe-HCl (1.5 g, 8.26 mmol) en MeOH (10 mL) y se añade TEA (1.15 mL, 8.26 mmol) y *p*-anisaldehído (1.2 mL, 9.91 mmol), dejando reaccionar a temperatura ambiente durante 1 h y 40 min. Transcurrido este tiempo se enfría la disolución a 0 °C y se añade  $\text{NaBH}_4$  (625 mg, 16.52 mmol) dejando reaccionar 45 min.

Tras la evaporación del disolvente, se disuelve el crudo en AcOEt y se lava con  $\text{H}_2\text{O}$  y disolución saturada NaCl, secando la fase orgánica sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Tras purificación por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyentes gradiente de 5 a 9 % de AcOEt en hexano, se aisló el derivado **56a** (2.00 g) en forma de sirupe con un 91 % de Rdto. HPLC:  $t_R$ = 4.03 min (A:B=35:65).  $[\alpha]_D^{25}$ = -29.83 ( $c$ =1.04,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.27 (d, 2H,  $J$ =8.5, 2-H y 6-H, Pmb), 6.88 (d, 2H,  $J$ =8.5, 3-H y 5-H, Pmb), 3.82 (s, 3H, *p*-OMe), 3.76 (d, 1H,  $J$ =12.6, N- $\text{CH}_2$ ), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.58 (d, 1H,  $J$ =12.6, N- $\text{CH}_2$ ), 3.28 (t, 1H,  $J$ =6.6,  $\alpha$ -H, Nle), 1.86 (m, 1H, NH), 1.62 (m, 2H,  $\beta$ -H, Nle), 1.33-1.25 (m, 4H,  $\gamma$ -H y  $\delta$ -H, Nle), 0.87 (m, 3H,  $\epsilon$ -H, Nle).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  176.1 (CO), 158.6 (4-C, Pmb), 131.9 (1-C, Pmb), 129.4 (2-C y 6-C, Pmb), 113.7 (3-C y 5-C, Pmb), 60.6 ( $\alpha$ -C, Nle), 55.2 (*p*-OMe), 51.6 (OMe), 51.5 (N- $\text{CH}_2$ ), 33.2 ( $\beta$ -C, Nle), 27.9 ( $\gamma$ -C, Nle), 22.5 ( $\delta$ -C, Nle), 13.9 ( $\epsilon$ -C, Nle).

EM (ES modo positivo): 266.1  $[M+1]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $C_{15}H_{23}NO_3$ : C, 67.90; H, 8.74; N, 5.28. Anal. Exp. (%): C, 67.67; H, 8.81; N, 5.28.

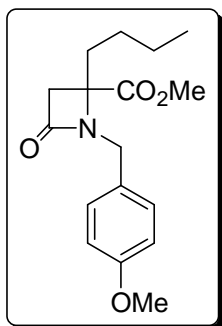
**Síntesis de *N*-cloroacetil-*N*-(*p*-metoxi)bencil-Nle-OMe (**57a**).**



Se disuelve Pmb-Nle-OMe (**56a**) (1.97 g, 7.44 mmol) en THF (10 mL) y se añade óxido de propileno (7.81 mL, 111.6 mmol). Se enfría la disolución a 0 °C y se añade cloruro de cloroacetilo (0.71 mL, 8.93 mmol). Tras 2 h de agitación se evapora el disolvente y se purifica el residuo resultante por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente gradiente de 14 a 20 % de AcOEt en hexano. De esta forma se obtiene cuantitativamente el producto **57a** (2.56 g) en forma de sirupe. HPLC:  $t_R$  = 18.62 min (A:B=40:60).  $[\alpha]_D = -49.69$  ( $c=1.03$ ,  $CHCl_3$ ).  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.14 (d, 2H,  $J=8.6$ , 2-H y 6-H, Pmb), 6.82 (d, 2H,  $J=8.6$ , 3-H y 5-H, Pmb), 4.57 (d, 1H,  $J=16.8$ , N-CH<sub>2</sub>), 4.46 (d, 1H,  $J=16.8$ , N-CH<sub>2</sub>), 4.24 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Nle), 4.00 (d, 1H,  $J=12.3$ , CH<sub>2</sub>-Cl), 3.95 (d, 1H,  $J=12.3$ , CH<sub>2</sub>-Cl), 3.74 (s, 3H, *p*-OMe), 3.56 (s, 3H, OMe), 1.92 (m, 1H,  $\beta$ -H, Nle), 1.69 (m, 1H,  $\beta$ -H, Nle), 1.25-1.09 (m, 4H,  $\gamma$ -H y  $\delta$ -H, Nle), 0.78 (m, 3H,  $\epsilon$ -Nle).  $^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  171.2 (CO-Nle), 167.5 (CO-N), 159.3 (4-C, Pmb), 129.5 (1-C, Pmb), 128.1 (2-C y 6-C, Pmb), 114.2 (3-C y 5-C, Pmb), 58.6 ( $\alpha$ -C, Nle), 55.3 (*p*-OMe), 52.0 (OMe), 50.3 (N-CH<sub>2</sub>), 41.7 (CH<sub>2</sub>-Cl), 28.8 ( $\beta$ -C, Nle), 28.5 ( $\gamma$ -C, Nle), 22.3 ( $\delta$ -C, Nle), 13.8 ( $\epsilon$ -Nle). EM (ES modo positivo): 364.0  $[M+Na]^+$ , 707.2  $[2M+Na]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $C_{17}H_{24}ClNO_4$ : C, 59.73; H, 7.08; Cl, 10.37; N, 4.10. Anal. Exp. (%): C, 59.80; H, 6.91; Cl, 10.29; N, 4.28.



**Síntesis de (R,S)-1-(p-metoxi)bencil-4-butil-4-metoxycarbonil-2-azetidinona [(R,S)-58a].**

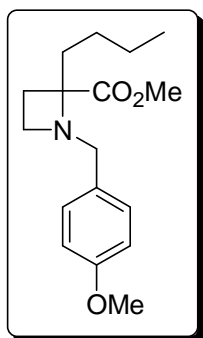


A una disolución del compuesto **57a** (2.50 g, 7.32 mmol) en CH<sub>3</sub>CN seco (15 mL) se añade Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.77 g, 14.64 mmol) bajo atmósfera de argón. Tras 8 días se evapora el disolvente a sequedad, se disuelve el crudo en AcOEt y se lava sucesivamente con HCl 0.1N, H<sub>2</sub>O y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el crudo se purifica en columna de gel de sílice utilizando como eluyente gradiente de 17 a 25 % de AcOEt en hexano, obteniéndose un

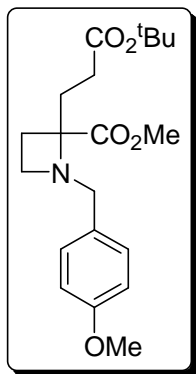
67 % del producto **(R,S)-58a** (1.49 g) en forma de sirupe. HPLC:  $t_R$  = 3.39 min (A:B=45:55). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.15 (d, 2H,  $J$ =8.7, 2-H y 6-H, Pmb), 6.78 (d, 2H,  $J$ =8.7, 3-H y 5-H, Pmb), 4.36 (d, 1H,  $J$ =15.3, 1-CH<sub>2</sub>), 4.24 (d, 1H,  $J$ =15.3, 1-CH<sub>2</sub>), 3.72 (s, 3H, *p*-OMe), 3.52 (s, 3H, OMe), 3.17 (d, 1H,  $J$ =14.5, H-3), 2.78 (d, 1H,  $J$ =14.5, H-3), 1.84 (m, 1H, 1'-H, Nle), 1.48 (m, 1H, 1'-H, Nle), 1.14-0.94 (m, 4H, 2'-H y 3'-H, Nle), 0.72 (t, 3H,  $J$ =7.0, 4'-Nle). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 172.0 (CO-OMe), 166.3 (2-CO), 159.0 (4-C, Pmb), 129.8 (2-C y 6-C, Pmb), 128.3 (1-C, Pmb), 113.8 (3-C y 5-C, Pmb), 62.5 (4-C), 55.2 (*p*-OMe), 52.2 (OMe), 45.5 (3-C), 44.1 (1-CH<sub>2</sub>), 33.2 (1'-C, Nle), 25.9 (2'-C, Nle), 22.5 (3'-C, Nle), 13.7 (4'-C, Nle). EM (ES modo positivo): 306.1 [M+1]<sup>+</sup>. Anal. (%) Calc. para C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>: C, 66.86; H, 7.59; N, 4.59. Anal. Exp. (%): C, 67.00; H, 7.34; N, 4.57.

**Síntesis de 2-alkil-2-carboxiazetidinas.**

*Procedimiento general:* A una disolución en THF seco (8 mL) de la correspondiente β-lactama convenientemente sustituida (4.80 mmol) y RhH(CO)(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (0.05 mmol) se añade Ph<sub>2</sub>SiH<sub>2</sub> (12 mmol) bajo atmósfera de argón. Tras 24 h de reacción se evapora el disolvente a sequedad, se disuelve el crudo en Et<sub>2</sub>O y se lava con HCl 1M. Se lleva la fase acuosa a pH=11 mediante adición de NaOH 2N y se extrae el producto con AcOEt, purificándose en columna de gel de sílice en el sistema de eluyentes indicado en cada caso.



**Pmb-(*R,S*)-Azo-OMe [(*R,S*)-59a]:** Aceite. Rdto. 83 % [A partir de (*R,S*)-58a]. Gradiente de 11 a 15 % de AcOEt en hexano. HPLC:  $t_R$  = 4.12 min (A:B=40:60).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.19 (d, 2H,  $J$ =8.7, 2-H y 6-H, Pmb), 6.82 (d, 2H,  $J$ =8.7, 3-H y 5-H, Pmb), 3.78 (s, 3H, *p*-OMe), 3.76 (s, 3H, OMe), 3.60 (s, 2H, 1-CH<sub>2</sub>), 3.10 (m, 2H, H-4), 2.53 (m, 1H, H-3), 1.95 (m, 2H, 1'-H), 1.80 (m, 1H, H-3), 1.43-1.07 (m, 4H, 2'-H, 3'-H), 0.91 (t, 3H,  $J$ =7.1, 4'-H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  174.1 (2-CO), 158.5 (4-C, Pmb), 130.5 (1-C, Pmb), 129.6 (2-C y 6-C, Pmb), 113.6 (3-C y 5-C, Pmb), 72.0 (2-C), 55.2 (1-CH<sub>2</sub>), 55.1 (*p*-OMe), 51.3 (OMe), 49.3 (4-C), 33.7 (1'-C), 26.1 (3-C), 26.0 (2'-C), 23.0 (3'-C), 14.0 (4'-C). EM (ES modo positivo): 292.1  $[\text{M}+1]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NO}_3$ : C, 70.07; H, 8.65; N, 4.81. Anal. Exp. (%): C, 70.20; H, 8.42; N, 4.75.



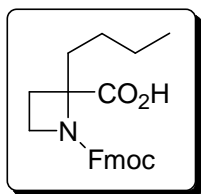
**Pmb-(*R,S*)-Aze(O<sup>t</sup>Bu)-OMe [(*R,S*)-59c]:** Sirupe. Rdto. 70 % [A partir de (*R,S*)-48c]. Gradiente de 12 a 17 % de AcOEt en hexano. HPLC:  $t_R$  = 11.65 min (A:B=40:60).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.19 (d, 2H,  $J$ =8.5, 2-H y 6-H, Pmb), 6.83 (d, 2H,  $J$ =8.5, 3-H y 5-H, Pmb), 3.78 (s, 3H, *p*-OMe), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.62 (d, 1H,  $J$ =12.6, 1-CH<sub>2</sub>), 3.55 (d, 1H,  $J$ =12.6, 1-CH<sub>2</sub>), 3.08 (m, 2H, H-4), 2.47 (m, 1H, H-3), 2.25 (m, 2H, 2'-H, Glu), 2.14 (m, 2H, 1'-H, Glu), 1.99 (m, 1H, H-3), 1.45 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.6 (2-CO), 172.6 (CO-O<sup>t</sup>Bu), 158.6 (4-C, Pmb), 130.3 (1-C, Pmb), 129.6 (2-C y 6-C, Pmb), 113.6 (3-C y 5-C, Pmb), 80.4 (C-<sup>t</sup>Bu), 71.2 (2-C), 55.2 (*p*-OMe), 55.1 (1-CH<sub>2</sub>), 51.5 (OMe), 49.3 (4-C), 30.3 (2'-C, Glu), 29.2 (1'-C, Glu), 28.1 (CH<sub>3</sub>-<sup>t</sup>Bu), 25.6 (3-C). EM (ES modo positivo): 364.2  $[\text{M}+1]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{NO}_3$ : C, 68.68; H, 7.68; N, 5.34. Anal. Exp. (%): C, 68.60; H, 7.77; N, 5.49.

### Síntesis de Fmoc-azetidinas.

**Método A:** Se disuelve el correspondiente derivado de azetidina (3.82 mmol) en MeOH (9 mL) y se añade NaOH 2N (7.64 mmol) dejando reaccionar 24 h a temperatura ambiente. Tras evaporar el disolvente, el crudo de reacción se disuelve en agua y se lava con AcOEt. Seguidamente se acidifica la fase acuosa a pH=2 mediante adición de HCl 1M, se extrae con AcOEt y la fase orgánica se seca ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se evapora a sequedad.

Sin mayor purificación se disuelve el producto en MeOH (70 mL) a 0 °C, se añade sucesivamente HCl concentrado (3.82 mmol) y Pd(OH)<sub>2</sub> (30 % en peso) y se hidrogena a 45 psi y 50 °C de temperatura durante 12 h. Tras filtración del catalizador, se evapora el disolvente a sequedad, se disuelve el crudo de reacción en H<sub>2</sub>O (4 mL) y se añade TEA (7.64 mmol). A esta disolución se le añade Fmoc-ONSu (4.58 mmol) disuelto en CH<sub>3</sub>CN a 60 °C y se va adicionando TEA hasta pH=8.5-9.0 durante los primeros 15 min de reacción. Seguidamente se deja reaccionar durante 30 min adicionales y se evapora el disolvente a sequedad. El crudo de reacción se disuelve en una mezcla HCl (1M)/AcOEt y se separan las fases. La fase orgánica se lava con disolución saturada de NaCl y se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tras evaporar el disolvente a sequedad, el producto obtenido se utiliza sin más purificación.

*Método B:* La hidrólisis del éster metílico y la eliminación del grupo *p*-(metoxi)bencilo mediante hidrogenolisis de los derivados de azetidina se realiza de manera idéntica al método A. El crudo obtenido de la reacción de hidrogenolisis se disuelve en una mezcla de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aq (10%)/dioxano (10 mL/6 mL) a 0 °C. Se añade Cl-Fmoc (3.82 mmol) disuelto en dioxano (6 mL) y se mantiene la temperatura de reacción a 0 °C durante 1 h, tras lo que se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 3 h más. Transcurrido este tiempo, se añade H<sub>2</sub>O a la reacción y se lava el crudo con Et<sub>2</sub>O. Se acidifica la fase acuosa mediante adición de HCl 1M hasta pH=2 y se extrae el producto con AcOEt. La fase orgánica se lava con H<sub>2</sub>O y se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, tras lo cual se evapora el disolvente a sequedad utilizando el producto sin más purificación.

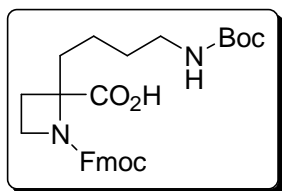


**Fmoc-(*R,S*)-Azo-OH [(*R,S*)-60a]:** Sirupe. Rdto. 32 % [A partir de (*R,S*)-59a, *Método A*]. HPLC:  $t_R$  = 12.22 min. (A:B=40:60).

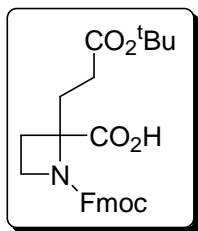
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.79-7.29 (m, 8H, Ph), 4.47 (d, 2H,  $J$ =7.0, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.22 (t, 1H,  $J$ =7.0, CH-Fmoc), 3.84 (m, 2H, H-4), 2.70 (m, 1H, H-3), 2.19 (m, 1H, H-3), 2.07 (m, 1H, 1'-H, Nle), 1.93 (m, 1H, 1'-H, Nle), 1.46-1.25 (m, 4H, 2'-H y 3'-H, Nle), 0.92 (m, 3H, 4'-H, Nle).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  173.8 (2-CO), 157.0 (CO-Fmoc), 143.3, 141.3 (C-Ph), 127.9, 127.1, 124.9, 120.0 (CH-Ph), 72.6 (2-C), 67.8 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 47.0 (CH-Fmoc), 45.0 (4-C), 34.4 (1'-C, Nle), 25.5 (3-C), 25.1 (2'-C, Nle), 22.5 (3'-C, Nle),

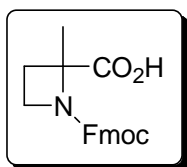
13.8 (4'-C, Nle). EM (ES modo positivo): 380.1  $[M+1]^+$ , 402.1  $[M+Na]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $C_{23}H_{25}NO_4$ : C, 72.80; H, 6.64; N, 3.69. Anal. Exp. (%): C, 72.66; H, 6.73; N, 3.67.



**Fmoc-(*R,S*)-Azk(Boc)-OH [(*R,S*)-60b]:** Sirupe. Rdto. 60 % [A partir de (*R,S*)-59b, Método B]. HPLC:  $t_R$  = 6.81 min. (A:B=40:60).  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.79-7.30 (m, 8H, Ph), 4.47 (d, 2H,  $J$ =7.0,  $CH_2$ -Fmoc), 4.23 (t, 1H,  $J$ =7.0, CH-Fmoc), 3.85 (m, 2H, H-4), 3.12 (m, 2H, 4'-H, Azk), 2.75 (m, 1H, H-3), 2.19 (m, 1H, H-3), 2.02 (m, 2H, 1'-H, Azk), 1.57-1.37 (m, 4H, 2'-H y 3'-H, Azk), 1.50 (s, 9H,  $^tBu$ ).  $^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  173.1 (2-CO), 170.3 (CO-Boc), 156.1 (CO-Fmoc), 143.4, 141.2 (C-Ph), 127.8, 127.0, 124.9, 119.9 (CH-Ph), 80.6 (C- $^tBu$ ), 72.0 (2-C), 67.6 ( $CH_2$ -Fmoc), 47.0 (CH-Fmoc), 45.3 (4-C), 40.0 (4'-C, Azk), 29.7 (1'-C, Azk), 28.3 ( $CH_3$ - $^tBu$ ), 28.1 (3'-C, Azk), 25.3 (3-C), 20.4 (2'-C, Azk). EM (ES modo positivo): 517.3  $[M+Na]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $C_{28}H_{34}N_2O_6$ : C, 68.00; H, 6.93; N, 5.66. Anal. Exp. (%): C, 67.94; H, 6.89; N, 5.74.



**Fmoc-(*R,S*)-Aze( $O^tBu$ )-OH [(*R,S*)-60c]:** Sirupe. Rdto. 65 % [A partir de (*R,S*)-59c, Método B]. HPLC:  $t_R$  = 8.91 min. (A:B=40:60).  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.77-7.25 (m, 8H, Ph), 4.47 (d, 2H,  $J$ =7.0,  $CH_2$ -Fmoc), 4.22 (t, 1H,  $J$ =7.0, CH-Fmoc), 3.84 (m, 2H, H-4), 2.70 (m, 1H, H-3), 2.35 (m, 2H, 2'-H, Aze), 2.26 (m, 2H, 1'-H, Aze), 2.20 (m, 1H, H-3), 1.43 (s, 9H,  $^tBu$ ).  $^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  173.0, 171.4 (CO), 157.2 (CO-Fmoc), 143.3, 141.4 (C-Ph), 127.9, 127.2, 124.9, 120.1 (CH-Ph), 81.0 (C- $^tBu$ ), 71.9 (2-C), 68.0 ( $CH_2$ -Fmoc), 47.1 (CH-Fmoc), 45.0 (4-C), 30.3 (2'-C, Aze), 29.4 (1'-C, Aze), 28.0 ( $CH_3$ - $^tBu$ ), 25.8 (3-C). EM (ES modo positivo): 474.2  $[M+Na]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $C_{26}H_{29}NO_6$ : C, 69.16; H, 6.47; N, 3.10. Anal. Exp. (%): C, 68.99; H, 6.58; N, 3.20.



**Fmoc-(*R,S*)-Aza-OH [(*R,S*)-78]:** Sirupe. Rdto. 57 % [A partir de (*R,S*)-10b, Método B]. HPLC:  $t_R$  = 6.35 min. (A:B=40:60).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.71-7.22 (m, 8H, Ph), 4.38 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -Fmoc), 4.16 (m, 1H, CH-Fmoc), 3.85 (m, 2H, H-4), 2.71 (m, 1H, H-3), 2.07 (ddd, 1H,  $J$ =11.7, 8.5, 5.6, H-3), 1.64 (s, 3H, 2- $\text{CH}_3$ , Aza).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  175.2 (2-CO), 156.0 (CO-Fmoc), 143.3, 141.0 (C-Ph), 127.4, 126.9, 124.6, 119.8 (CH-Ph), 68.0 (2-C), 66.5 ( $\text{CH}_2$ -Fmoc), 46.9 (CH-Fmoc), 45.2 (4-C), 28.3 (3-C), 21.9 (2- $\text{CH}_3$ , Aza). EM (ES modo positivo): 338.3  $[\text{M}+1]^+$ . Anal. (%) Calc. para  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ : C, 71.20; H, 5.68; N, 4.15. Anal. Exp. (%): C, 71.13; H, 5.57; N, 4.16.

## 2.6.2. Procedimiento general de síntesis en fase sólida.

### 2.6.2.1. Métodos analíticos.

#### 2.6.2.1.1. Ensayo de ninhidrina.

El ensayo de ninhidrina o ensayo de Kaiser se emplea para evaluar cualitativamente la extensión de los acoplamiento sobre aminas primarias.

*Procedimiento general:* A una alícuota de resina seca (3-4 mg) se le añaden 6 gotas del reactivo A y 3 gotas del reactivo B, calentándose la mezcla a 110 °C durante 3 min. Una coloración azul o azul-verdosa de la resina o el sobrenadante indica la presencia de aminas primarias (ensayo positivo), mientras que una coloración amarilla indica ausencia de aminas primarias (ensayo negativo).

Reactivo A: Se disuelven 40 mg de fenol en 10 mL de EtOH absoluto en caliente. Por otro lado se prepara una disolución de 65 mg de KCN en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y se diluyen 2 mL de esta disolución en 100 mL de piridina recién destilada sobre ninhidrina. Ambas disoluciones se agitan por separado con 4 g de resina Amberlite MB-3 durante 45 min. Seguidamente se filtran y se mezclan los dos filtrados.

Reactivo B: Disolución de ninhidrina (2.5 g) en EtOH absoluto (50 mL). La disolución se almacena protegida de la luz, preferiblemente bajo atmósfera inerte.

#### **2.6.2.1.2. Ensayo del cloranilo.**

El ensayo del cloranilo cualitativo se utiliza para evaluar la extensión de los acoplamientos peptídicos sobre aminas secundarias. El procedimiento consiste en preparar una disolución saturada de cloranilo (2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona) en tolueno (750 mg en 25 mL). A una alícuota, 0.5-2.0 mg de resina lavada y seca, se adicionan 5 gotas de la solución de cloranilo y 15 gotas de acetona, agitándose la mezcla a temperatura ambiente durante 5 min. Una coloración azul-verdosa de la disolución o la resina (ensayo positivo) indica la existencia de aminas secundarias libres, mientras que una coloración amarilla (ensayo negativo) indica la ausencia de éstas.

#### **2.6.2.1.3. Ensayo de *p*-nitrofeniléster del rojo disperso I cualitativo.**

Este ensayo permite detectar la presencia de aminas secundarias libres en una resina con una mayor sensibilidad que el test de cloroanilo, sirviendo como control de la extensión con la que se ha producido un acoplamiento.

*Procedimiento general:* Se toman 0.5-2.0 mg de resina seca y se añade 10 gotas de reactivo (disolución del *p*-nitrofeniléster del rojo disperso I en CH<sub>3</sub>CN). La mezcla se calienta a 60 °C durante 10 min. Se elimina el sobrenadante y se lava la resina 5 veces con DMF y otras 2 con EtOH.

Una coloración rojiza o rosada de la resina (ensayo positivo) indica la presencia de aminas secundarias o primarias libres en el soporte polimérico, mientras que la ausencia de color en los granos de resina (ensayo negativo) indica la ausencia de aminas libres.

El *p*-nitrofeniléster del rojo disperso I se obtiene mediante un proceso en tres etapas. Partiendo del colorante comercial Rojo disperso I se hace reaccionar con diacetato de etilo, se saponifica y se condensa con *p*-nitrofenol utilizando POCl<sub>3</sub>, purificando el producto obtenido por recristalización. El *p*-nitrofeniléster del rojo disperso I se utiliza en una concentración 0.02 M en CH<sub>3</sub>CN.

#### 2.6.2.1.4. Ensayo de Gisin.

Este ensayo permite cuantificar el contenido de aminas libres en un polímero. Se emplea principalmente para determinar la funcionalización de Fmoc-peptidil-resinas, por lo que es preciso un paso previo de eliminación del grupo protector.

*Procedimiento general:* Se pesan 5-10 mg de resina seca y se les somete a los siguientes protocolos:

#### Eliminación del grupo Fmoc. Determinación de *N*-fluorenilmetilpiperidina.

Etapas	Reactivo/Disolvente	Operación	Tratamientos	Tiempo
1	DCM	Hinchado de la resina	3	15 s
2	DMF		2	15 s
3	20% piperidina en DMF	Eliminación del grupo Fmoc	3	10 min
4	DMF	Lavados	3	15 s
5	DCM		3	15 s

En el paso 3 se elimina el grupo Fmoc y se forma la *N*-fluorenilmetilpiperidina. Se recogen en un matraz aforado de 200 mL los filtrados de los pasos 3-5 y se enrasa con DCM. Se mide la absorbancia al UV a 301 nm y se aplica la ecuación de la ley de Lambert-Beer ( $\epsilon=7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) para cuantificar la concentración de grupos Fmoc presentes en la alícuota, cuantificándose así la carga de la resina.

#### Determinación de la concentración de aminas.

Una vez la función amino se encuentra libre, se realiza el siguiente tratamiento:

Etapas	Reactivo/Disolvente	Operación	Tratamientos	Tiempo
1	Ac. Pírico 0.01 M en DCM	Formación del picrato amónico	2	3 min
2	DCM	Lavados	3	15 s
3	DIEA / DCM (1:19, v/v)	Liberación de la sal	3	1 min
4	DCM	Lavados	3	15 s

Los filtrados de las etapas 3 y 4 se recogen en un matraz aforado de 100 mL y se enrasan con al menos un 80 % de EtOH. Se mide la absorbancia al UV a 358 nm y se utiliza la

ecuación de la ley de Lambert-Beer ( $\epsilon=14500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) con el fin de cuantificar la cantidad de aminas libres que contiene la muestra de resina pesada.

### 2.6.2.2. Protocolos de síntesis en fase sólida.

Todas las reacciones fueron realizadas sobre una resina Wang y jeringas de polipropileno provistas de una placa filtrante de polietileno poroso. Para realizar los distintos tratamientos se mantiene la matriz sólida dentro de la jeringa y se añade una cantidad de reactivo-disolvente suficiente para cubrir e hinchar totalmente el polímero, agitándose con una varilla de teflón. Acabados los diferentes tratamientos, el disolvente, exceso de reactivos y subproductos formados en el transcurso de la reacción, son eliminados por filtración.

#### 2.6.2.2.1. Incorporación de Fmoc-aminoácidos para análogos de NGF.

Todas las elongaciones de la cadena peptídica se realizaron según el siguiente esquema general.

Etapa	Reactivo/Disolvente	Operación	Tratamientos	Tiempo
1	DCM	Hinchado de la resina	4	30 s
2	DMF		4	30 s
3	DCM		4	30 s
4	DMF		4	30 s
5	20% piperidina en DMF	Eliminación del grupo Fmoc	1	1 min
			3	10 min
6	DMF	Lavados	5	30 s
7	DCM		5	30 s
8	DMF		5	30 s
9 <sup>a</sup>	1.5 eq. Fmoc-aa-OH / 1.5 eq. HOBt / 3 eq. DIC	Acoplamiento	1	1 h
10	DMF	Lavados	4	30 s
11	DCM		4	30 s
12	DMF		4	30 s
13	DCM		4	30 s

<sup>a</sup> Cuando el NH sobre el que se realiza el acoplamiento peptídico es secundario, las cantidades de reactivo son 3 eq. Fmoc-aa-OH / 3 eq. HOBt / 6 eq. DIC.



Finalizado el tratamiento se realiza el correspondiente test de ninhidrina o cloranilo. Si el ensayo resulta positivo se vuelve a realizar el acoplamiento comenzando desde la etapa 7. Si el ensayo es negativo se procede a la incorporación del siguiente aminoácido empezando por la etapa 1.

#### 2.6.2.2.2. Incorporación de Fmoc-aminoácidos para análogos de BDNF.

##### 2.6.2.2.2.1. Anclaje del primer aminoácido a la resina.

Etapas	Reactivo/Disolvente	Operación	Tratamientos	Tiempo
1	DCM	Hinchado de la resina	5	30 s
2	DMF		5	30 s
3	DSC (10 eq)/DMAP (1 eq) DMF (anh)/Ar	Activación de la resina	1	2 h
4	DMF	Lavados	5	30 s
5	Fmoc-Lys-OAl (10 eq) DMF (anh)/DIEA (20 eq)/Ar	Incorporación de Fmoc-Lys-OAl	1	4 h
6	DMF	Lavados	5	30 s
7	DCM		5	30 s

Una vez terminado el anclaje del primer aminoácido a la resina se realiza el ensayo de Gisin para determinar la nueva funcionalización de la resina.

##### 2.6.2.2.2.2. Protocolo general de síntesis Fmoc/<sup>t</sup>Bu.

El crecimiento de la cadena peptídica se realizó según el siguiente esquema general, con excepción del primer aminoácido que se incorpora como se especifica en el apartado 2.6.2.2.2.1.

Etapas	Reactivo/Disolvente	Operación	Tratamientos	Tiempo
1	DCM	Hinchado de la resina	5	30 s
2	DMF		5	30 s
3	20% piperidina en DMF	Eliminación del grupo Fmoc	1	1 min 20 min
4	DMF	Lavados	5	30 s
5	DCM		5	30 s
6	DMF		5	30 s
7	Fmoc-aa-OH (3 eq) HBTU (3 eq)/DIEA (6 eq)	Acoplamiento	1	1 h
8	DMF	Lavados	5	30 s
9	DCM		5	30 s

Finalizado el tratamiento se realiza el correspondiente test de ninhidrina o de *p*-nitrofeniléster del rojo disperso I. Si el ensayo resulta positivo se vuelve a realizar el acoplamiento comenzando desde la etapa 5, mientras que si resulta negativo se procede a la incorporación del siguiente aminoácido.

#### 2.6.2.2.3. Protocolo general de eliminación del grupo alilo.

La eliminación del grupo protector alilo del extremo C-terminal se llevó a cabo mediante el protocolo descrito a continuación.

Etapas	Reactivo/Disolvente	Operación	Tratamientos	Tiempo
1	DCM	Hinchado de la resina	5	1 min
2	DCM (anh) / Ar		5	1 min
3	Pd (PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (0.1 eq)/DCM (anh) PhSiH <sub>3</sub> (24 eq)	Eliminación del grupo alilo	2	30 min
4	DCM (anh) / Ar	Lavados	5	1 min
5	DCM		5	1 min
6	DMF		5	1 min
7	Et <sub>2</sub> NCSSNa (0.02 M) en DMF	Eliminación de Pd	5	1 min
8	DMF	Lavados	5	1 min
9	DCM		5	1 min

#### 2.6.2.2.4. Protocolo general de ciclación intramolecular.

Una vez finalizada la elongación de la cadena peptídica y liberado el extremo C-terminal protegido con el grupo alilo, se realizó la correspondiente ciclación intramolecular, previa desprotección del grupo Fmoc, según el siguiente esquema.

Etapa	Reactivo/Disolvente	Operación	Tratamientos	Tiempo
1	DCM	Hinchado de la resina	5	30 s
2	DMF		5	30 s
3	20% piperidina en DMF	Eliminación del grupo Fmoc	1	1 min 20 min
4	DMF	Lavados	5	30 s
5	DCM		5	30 s
6	DMF		5	30 s
7	PyBOP (10 eq)/HOBt (10 eq) DIEA (20 eq)	Ciclación	1	2 h
8	DMF	Lavados	5	30 s
9	DCM		5	30 s

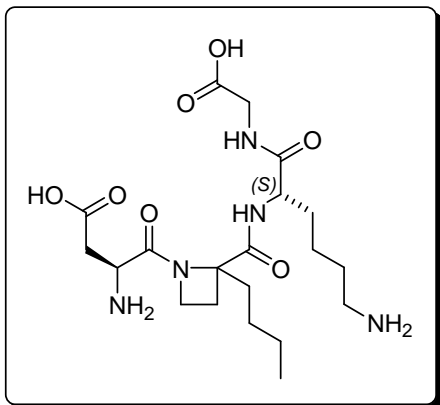
Acabado el protocolo se realiza el correspondiente ensayo de ninhidrina. Si éste resulta positivo se vuelve a realizar el acoplamiento comenzando desde la etapa 5. Por el contrario, si el ensayo resulta negativo se procede al desanclaje del péptido.

#### 2.6.2.3. Síntesis en fase sólida de análogos de NGF.

##### 2.6.2.3.1. Síntesis de Asp-Azo-Xaa-Gly; Xaa= Lys, Arg.

*Procedimiento general:* A dos jeringas de polipropileno se añaden 268 mg de resina Wang *N*-Fmoc-Gly ( $f=0.82$  mmol de péptido/g de resina), y a continuación Fmoc-Lys(Boc)-OH (155 mg, 0.33 mmol) o Fmoc-Arg(Pbf)-OH (214 mg, 0.33 mmol). Seguidamente se procede a la elongación de la cadena peptídica, acoplando el tercer residuo (Fmoc-Azo-OH, 125 mg, 0.33 mmol) y finalmente el cuarto aminoácido (Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH, 272 mg, 0.66 mmol) a cada uno de los péptidos. Todos estos acoplamientos se realizaron según el protocolo 2.6.2.2.1. A continuación se elimina el

grupo Fmoc del extremo *N*-terminal (etapas 1-7 del protocolo 2.6.2.2.1). Para la escisión de los compuestos, se tratan las resinas durante 3 h con los cócteles indicados en cada caso. Transcurrido el tiempo indicado se filtra la resina y se evapora el disolvente a sequedad, lavando el crudo con Et<sub>2</sub>O y DCM.



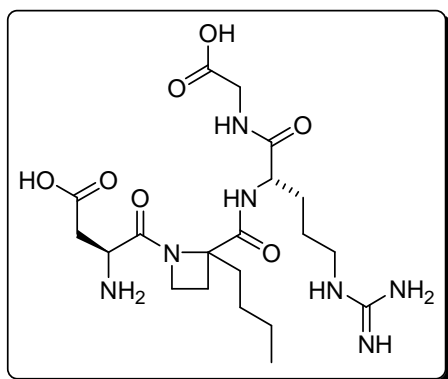
**H-Asp-(*R,S*)-Azo-Lys-Gly-OH · 2 TFA**

**[(*R,S*)-50]:** Sirupe. Rdto. 53 % [la escisión del péptido se realiza con TFA/H<sub>2</sub>O (95:5, v/v)].

HPLC: *t<sub>R</sub>* = 9.68 min. (Gradiente de 0 a 100 % de A en B). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

Proporción de diastereoisómeros 1.2:1. Diastereoisómero mayoritario: δ 8.23 (t, 1H, *J*=5.1, NH-Gly), 8.09 (d, 1H, *J*=8.2, NH-Lys), 7.86 (m, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.29 (m, 1H, α-H, Lys), 4.05 (m, 3H, H-4, α-H, Asp), 3.73 (m, 2H,

α-H, Gly), 2.82 (m, 1H, β-H, Asp), 2.72 (m, 2H, ε-H, Lys), 2.62 (m, 1H, β-H, Asp), 2.13 (m, 2H, H-3), 1.96 (m, 2H, 1'-H, Nle), 1.48 (m, 4H, β-H y δ-H, Lys), 1.22 (m, 6H, γ-H, Lys, 2'-H y 3'-H, Nle), 0.82 (t, 3H, *J*=6.5, 4'-H, Nle). Diastereoisómero minoritario: δ 8.21 (t, 1H, *J*=5.1, NH-Gly), 8.12 (d, 1H, *J*=8.1, NH-Lys), 7.86 (m, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.29 (m, 1H, α-H, Lys), 4.13 (m, 2H, H-4), 4.01 (m, 1H, α-H, Asp), 3.73 (m, 2H, α-H, Gly), 2.82 (m, 1H, β-H, Asp), 2.72 (m, 3H, ε-H, Lys, β-H, Asp), 2.40 (m, 2H, H-3), 1.96 (m, 2H, 1'-H, Nle), 1.48 (m, 4H, β-H y δ-H, Lys), 1.22 (m, 6H, γ-H, Lys, 2'-H y 3'-H, Nle), 0.82 (t, 3H, *J*=6.5, 4'-H, Nle). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): Diastereoisómero mayoritario: δ 171.5, 171.4, 171.1, 170.6, 168.4 (CO), 74.1 (2-C), 52.1 (α-C, Lys), 46.3 (4-C), 45.9 (α-C, Asp), 40.6 (α-C, Gly), 38.7 (ε-C, Lys), 35.2 (β-C, Asp), 34.1 (1'-C, Nle), 31.7 (β-C, Lys), 26.7 (δ-C, Lys), 24.5 (3-C), 23.9, 22.2, 21.8 (γ-C, Lys, 2'-C y 3'-C, Nle), 13.8 (4'-C, Nle). Diastereoisómero minoritario: δ 171.5, 171.4, 171.2, 170.9, 167.7 (CO), 73.5 (2-C), 52.1 (α-C, Lys), 46.5 (4-C), 45.8 (α-C, Asp), 40.7 (α-C, Gly), 38.5 (ε-C, Lys), 34.7 (β-C, Asp), 33.4 (1'-C, Nle), 31.2 (β-C, Lys), 26.5 (δ-C, Lys), 24.7 (3-C), 24.0, 22.2, 21.9 (γ-C, Lys, 2'-C y 3'-C, Nle), 13.9 (4'-C, Nle). EM (ES modo positivo): 458.3 [M+1]<sup>+</sup>.

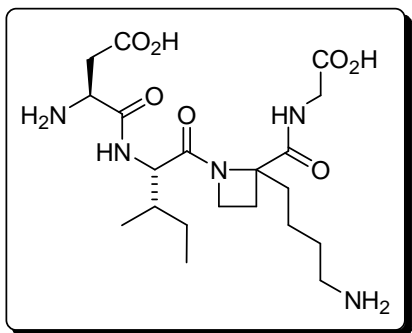


**H-Asp-(*R,S*)-Azo-Arg-Gly-OH · 2 TFA**

**[(*R,S*)-51]:** Sólido blanco. Rdto. 51 % [la escisión del péptido se lleva a cabo utilizando una disolución de TFA/EDT/TA/H<sub>2</sub>O/TIS (75:10:10:4:1, v/v/v/v/v)]. HPLC: *t<sub>R</sub>*= 9.95 min. (Gradiente de 0 a 100 % de A en B). <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): Proporción de diastereoisómeros 1.3:1. Diastereoisómero mayoritario: δ 9.29 (s a, 1H, NH-εArg), 8.45

(d, 1H, *J*=8.2, NH-Arg), 7.92 (t, 1H, *J*=5.8, NH-Gly), 7.16 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>-Arg), 4.26 (m, 1H, α-H, Arg), 4.12 (m, 2H, H-4), 3.95 (m, 1H, α-H, Asp), 3.72 (m, 2H, α-H, Gly), 3.09 (m, 1H, δ-H, Arg), 2.99 (m, 1H, δ-H, Arg), 2.66 (m, 1H, β-H, Asp), 2.51 (m, 1H, β-H, Asp), 2.34 (m, 1H, H-3), 2.20 (m, 1H, H-3), 1.91 (m, 2H, 1'-H, Nle), 1.60 (m, 2H, β-H, Arg), 1.52 (m, 2H, γ-H, Arg), 1.38-1.14 (m, 4H, 2'-H y 3'-H, Nle), 0.84 (t, 3H, *J*=7.0, 4'-H, Nle), Diastereoisómero minoritario: δ 8.52 (d, 1H, *J*=7.5, NH-Arg), 8.44 (m, 1H, NH-Gly), 8.14 (s a, 1H, NH-guanidina), 7.27 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.07 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>-guanidina), 4.56 (m, 1H, H-4), 4.12 (m, 2H, α-H, Arg, H-4), 3.81 (m, 2H, α-H, Asp, α-H, Gly), 3.57 (m, 1H, α-H, Gly), 3.09 (m, 1H, δ-H, Arg), 2.99 (m, 1H, δ-H, Arg), 2.70 (m, 1H, β-H, Asp), 2.60 (m, 1H, β-H, Asp), 2.34 (m, 1H, H-3), 2.12 (m, 1H, H-3), 1.91 (m, 2H, 1'-H, Nle), 1.81 (m, 2H, β-H, Arg), 1.38 (m, 2H, γ-H, Arg), 1.38-1.14 (m, 4H, 2'-H y 3'-H, Nle), 0.84 (t, 3H, *J*=7.0, 4'-H, Nle). <sup>13</sup>C RMN (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): Diastereoisómero mayoritario: δ 172.8, 171.7, 171.6, 170.9, 168.6 (CO), 73.3 (2-C), 52.3 (α-C, Arg), 46.6 (4-C), 46.6 (α-C, Asp), 40.6 (α-C, Gly), 39.9 (δ-C, Arg), 37.1 (β-C, Asp), 33.9 (1'-C, Nle), 29.1 (β-C, Arg), 24.7 (3'-C, Nle), 24.5 (3-C), 24.1 (γ-C, Arg), 22.4 (2'-C, Nle), 13.9 (4'-C, Nle), Diastereoisómero minoritario: δ 172.5, 171.7, 171.2, 170.7, 167.5 (CO), 72.3 (2-C), 53.9 (α-C, Arg), 46.6 (α-C, Asp), 45.6 (4-C), 40.8 (α-C, Gly), 39.9 (δ-C, Arg), 35.1 (β-C, Asp), 32.5 (1'-C, Nle), 29.1 (β-C, Arg), 24.7 (3'-C, Nle), 24.5 (3-C), 24.1 (γ-C, Arg), 22.4 (2'-C, Nle), 13.8 (4'-C, Nle). EM (ES modo positivo): 486.3 [M+1]<sup>+</sup>.

### 2.6.2.3.2. Síntesis de H-Asp-Ile-(*R,S*)-Azk-Gly-OH · 2 TFA [(*R,S*)-52]:



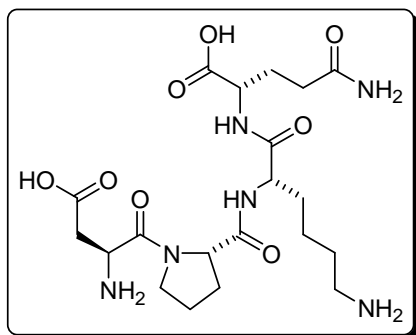
*Procedimiento general:* Se hace reaccionar 268 mg de resina Wang *N*-Fmoc-Gly ( $f=0.82$  mmol de péptido/g de resina) sucesivamente con Fmoc-Azk(Boc)-OH [(*R,S*)-60b, 217mg, 0.44 mmol], Fmoc-Ile-OH (233 mg, 0.66 mmol) y Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH (271 mg, 0.66 mmol), según el protocolo descrito en el apartado 2.6.2.2.1. El ensayo de cloranilo después del

acoplamiento sobre Azk resultó positivo, por lo que fue necesario repetir el acoplamiento en las mismas condiciones. Tras eliminar el grupo Fmoc del extremo *N*-terminal (etapas 1-7 del protocolo 2.6.2.2.1) se trata la resina con 2 mL de una disolución de TFA/H<sub>2</sub>O (95:5, v/v) durante 2 h hasta conseguir la escisión de los compuestos. Seguidamente, se filtra la resina y se evapora el disolvente a sequedad, lavándose el crudo con Et<sub>2</sub>O y DCM. De esta forma se obtienen 140 mg de (*R,S*)-54 (74 % de Rdto.) en forma de sirupe. HPLC:  $t_R=9.07$  min. (Gradiente de 0 a 100 % de A en B, diastereoisómero mayoritario) y 10.16 (Gradiente de 0 a 100 % de A en B, diastereoisómero minoritario). <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): Proporción de diastereoisómeros 2:1. Diastereoisómero mayoritario:  $\delta$  8.77 (d, 1H,  $J=7.8$ , NH-Ile), 8.29 (t, 1H,  $J=5.9$ , NH-Gly), 7.84 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.09 (m, 3H,  $\alpha$ -H, Asp, H-4), 3.92 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ile), 3.84 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gly), 3.76 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gly), 2.73 (m, 2H, 4'-H, Azk), 2.68 (m, 2H,  $\beta$ -H, Asp), 2.36 (m, 1H, H-3), 2.19 (m, 1H, H-3), 1.93 (m, 2H, 1'-H, Azk), 1.72 (m, 1H,  $\beta$ -H, Ile), 1.52 (m, 3H, 3'-H, Azk,  $\gamma$ -H, Ile), 1.42 (m, 1H, 2'-H, Azk), 1.25 (m, 1H, 2'-H, Azk), 1.09 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Ile), 0.88 (d, 3H,  $J=6.8$ ,  $\beta$ -CH<sub>3</sub>, Ile), 0.83 (t, 3H,  $J=7.3$ ,  $\delta$ -H, Ile), Diastereoisómero minoritario:  $\delta$  8.74 (d, 1H,  $J=8.3$ , NH-Ile), 8.32 (t, 1H,  $J=5.8$ , NH-Gly), 7.84 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.09 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Asp), 4.02 (m, 2H, H-4), 3.92 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ile), 3.84 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gly), 3.76 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gly), 2.73 (m, 2H, 4'-H, Azk), 2.68 (m, 2H,  $\beta$ -H, Asp), 2.45 (m, 1H, H-3), 2.11 (m, 1H, H-3), 2.00 (m, 2H, 1'-H, Azk), 1.72 (m, 1H,  $\beta$ -H, Ile), 1.52 (m, 3H, 3'-H, Azk,  $\gamma$ -H, Ile), 1.42 (m, 1H, 2'-H, Azk), 1.25 (m, 1H, 2'-H, Azk), 1.09 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Ile), 0.82 (d, 3H,  $J=8.3$ ,  $\beta$ -CH<sub>3</sub>, Ile), 0.81 (t, 3H,  $J=7.3$ ,  $\delta$ -H, Ile). <sup>13</sup>C RMN (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): Diastereoisómero mayoritario:  $\delta$  173.1, 172.0, 171.6, 171.5, 168.8 (CO), 74.0 (2-C), 54.3

( $\alpha$ -C, Ile), 49.3 ( $\alpha$ -C, Asp), 47.0 (4-C), 41.6 ( $\alpha$ -C, Gly), 39.4 (4'-C, Azk), 36.1 ( $\beta$ -C, Asp), 35.6 ( $\beta$ -C, Ile), 34.4 (1'-C, Azk), 27.7 (3'-C, Azk), 24.9 ( $\gamma$ -C, Ile), 24.6 (3-C), 20.7 (2'-C, Azk), 15.6 ( $\beta$ -CH<sub>3</sub>, Ile), 11.4 ( $\delta$ -C, Ile), Diastereoisómero minoritario:  $\delta$  173.5, 172.3, 171.6, 171.4, 168.4 (CO), 74.1 (2-C), 54.3 ( $\alpha$ -C, Ile), 49.3 ( $\alpha$ -C, Asp), 46.9 (4-C), 41.6 ( $\alpha$ -C, Gly), 39.3 (4'-C, Azk), 36.1 ( $\beta$ -C, Asp), 35.6 ( $\beta$ -C, Ile), 34.4 (1'-C, Azk), 27.6 (3'-C, Azk), 24.8 ( $\gamma$ -C, Ile), 23.9 (3-C), 20.1 (2'-C, Azk), 15.4 ( $\beta$ -CH<sub>3</sub>, Ile), 11.5 ( $\delta$ -C, Ile). EM (ES modo positivo): 458.3 [M+1]<sup>+</sup>.

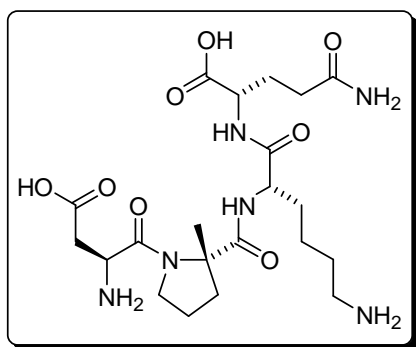
#### 2.6.2.3.3. Síntesis de Asp-Xaa-Lys-Gln; Xaa= Azg, Pro, $\alpha$ -MePro.

*Procedimiento general:* 966 mg de resina Wang *N*-Fmoc-Gln(Trt) (f=0.59 mmol de péptido/g de resina) se hacen reaccionar con Fmoc-Lys(Boc)-OH (401 mg, 0.85 mmol) mediante el tratamiento descrito en el apartado 2.6.2.2.1. A continuación se divide la resina en 3 partes iguales y se incorpora el tercer aminoácido, Fmoc-Azg-OH (92 mg, 0.28 mmol), Fmoc-Pro-OH (96 mg, 0.28 mmol) o Fmoc- $\alpha$ -MePro-OH (**55**, 100 mg, 0.28 mmol). Posteriormente, a cada uno de estos tripéptidos anclados se les acopla Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH [(*R,S*)-**60c**, 235 mg, 0.57 mmol]. Todos los acoplamientos se realizaron según el protocolo 2.6.2.2.1, y las reacciones se monitorizaron mediante los ensayos de ninhidrina o cloranilo, que resultaron negativos después de un solo acoplamiento. Tras la eliminación del grupo Fmoc del extremo *N*-terminal (etapas 1-7 del protocolo 2.6.2.2) se deja reaccionar el péptido con 3 mL de un cóctel que contiene TFA/EDT/TA/H<sub>2</sub>O/TIS (75:10:10:4:1, v/v/v/v/v) durante 3 h. Transcurrido el tiempo se filtra la resina y se evapora la disolución resultante a sequedad, lavando el crudo con Et<sub>2</sub>O y DCM.



**H-Asp-Pro-Lys-Gln-OH · 2 TFA (46):** Sirupe. Rdto. 64 %. HPLC:  $t_R$ = 5.57 min. (Gradiente de 0 a 100 % de A en B). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>= -50.11 (c=0.91, H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Proporción de rotámeros 4.5:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  8.05 (d, 1H, *J*=7.1, NH-Lys), 8.01 (d, 1H, *J*=8.3, NH-Gln), 7.78 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.30 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 6.81 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 4.39

(m, 2H,  $\alpha$ -H, Pro,  $\alpha$ -H, Asp), 4.16 (m, 2H,  $\alpha$ -H, Lys,  $\alpha$ -H, Gln), 3.63 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 3.55 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.82 (dd, 1H,  $J=17.7$ , 4.3,  $\beta$ -H, Asp), 2.76 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.60 (dd, 1H,  $J=17.7$ , 8.1,  $\beta$ -H, Asp), 2.11 (m, 3H,  $\beta$ -H y  $\gamma$ -H, Gln), 1.95 (m, 1H,  $\beta$ -H, Gln), 1.86 (m, 3H,  $\beta$ -H y  $\gamma$ -H, Pro), 1.77 (m, 1H,  $\beta$ -H, Gln), 1.65 (m, 1H,  $\delta$ -H, Lys), 1.52 (m, 3H,  $\beta$ -H, Lys,  $\delta$ -H, Lys), 1.35 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Lys), Rotámero minoritario:  $\delta$  8.37 (d, 1H,  $J=7.6$ , NH-Lys), 8.30 (d, 1H,  $J=7.8$ , NH-Gln), 7.78 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.30 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 6.81 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 4.57 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Pro), 4.31 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Lys), 4.03 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gln), 3.82 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Asp), 3.63 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 3.55 (m, 1H,  $\delta$ -H, Pro), 2.82 (m, 1H,  $\beta$ -H, Asp), 2.76 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.60 (m, 1H,  $\beta$ -H, Asp), 2.25-1.70 (m, 8H,  $\beta$ -H y  $\gamma$ -H, Pro,  $\beta$ -H y  $\gamma$ -H, Gln), 1.65 (m, 1H,  $\delta$ -H, Lys), 1.52 (m, 3H,  $\beta$ -H, Lys,  $\delta$ -H, Lys), 1.35 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Lys). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Rotámero mayoritario:  $\delta$  173.8, 173.3, 171.6, 171.3, 170.9, 167.1 (CO), 59.8 ( $\alpha$ -C, Pro), 52.4 ( $\alpha$ -C, Lys), 51.6 ( $\alpha$ -C, Gln), 47.9 ( $\alpha$ -C, Asp), 47.1 ( $\delta$ -C, Pro), 38.6 ( $\epsilon$ -C, Lys), 35.3 ( $\beta$ -C, Asp), 31.4 ( $\gamma$ -C, Gln), 31.1 ( $\delta$ -C, Lys), 29.3 ( $\beta$ -C, Pro), 27.0 ( $\beta$ -C, Gln), 26.6 ( $\beta$ -C, Lys), 24.5 ( $\gamma$ -C, Pro), 22.1 ( $\gamma$ -C, Lys), Rotámero minoritario:  $\delta$  173.6, 173.3, 171.3, 171.2, 170.9, 167.0 (CO), 59.1 ( $\alpha$ -C, Pro), 52.3 ( $\alpha$ -C, Lys), 51.6 ( $\alpha$ -C, Gln), 48.9 ( $\alpha$ -C, Asp), 48.5 ( $\delta$ -C, Pro), 39.0 ( $\epsilon$ -C, Lys), 36.3 ( $\beta$ -C, Asp), 31.7 ( $\gamma$ -C, Gln), 31.3 ( $\delta$ -C, Lys), 29.3 ( $\beta$ -C, Pro), 26.8 ( $\beta$ -C, Gln), 26.7 ( $\beta$ -C, Lys), 24.5 ( $\gamma$ -C, Pro), 22.4 ( $\gamma$ -C, Lys). EM (ES modo positivo): 487.3 [M+1]<sup>+</sup>.



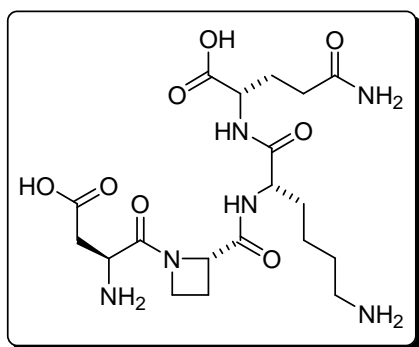
**H-Asp- $\alpha$ MePro-Lys-Gln-OH · 2 TFA (47):**

Sirupe. Rdto. 67 %. HPLC:  $t_R$  = 7.68 min. (Gradiente de 0 a 100 % de A en B).  $[\alpha]_D^{25} = -24.07$  ( $c=0.78$ , H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  7.84 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.78 (d, 1H,  $J=7.7$ , NH-Gln), 7.44 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 7.42 (d, 1H,  $J=7.3$ , NH-Lys), 6.90 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 4.36 (t, 1H,  $J=6.3$ ,  $\alpha$ -H, Asp), 4.19 (m, 1H,  $\alpha$ -H,

Lys), 4.12 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gln), 3.71 (m, 2H,  $\delta$ -H, Pro), 3.00 (dd, 1H,  $J=17.7$ , 5.0,  $\beta$ -H, Asp), 2.77 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.64 (dd, 1H,  $J=17.7$ , 7.6,  $\beta$ -H, Asp), 2.11 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Gln), 1.93 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Pro), 1.88 (m, 2H,  $\beta$ -H, Gln), 1.84 (m, 2H,  $\beta$ -H, Pro), 1.75 (m,



1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.56 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.50 (s, 2H,  $\delta$ -H, Lys), 1.49 (m, 3H,  $\alpha$ -CH<sub>3</sub>, Pro), 1.34 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Lys). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  174.7, 173.9, 173.1, 172.2, 172.1, 167.4 (CO), 68.1 ( $\alpha$ -C, Pro), 53.0 ( $\alpha$ -C, Lys), 52.2 ( $\alpha$ -C, Gln), 48.6 ( $\alpha$ -C, Asp,  $\delta$ -C, Pro), 39.3 ( $\epsilon$ -C, Lys,  $\beta$ -C, Pro), 35.1 ( $\beta$ -C, Asp), 32.0 ( $\gamma$ -C, Gln), 31.3 ( $\beta$ -C, Lys), 27.6 ( $\beta$ -C, Gln), 27.2 ( $\delta$ -C, Lys), 23.7 ( $\gamma$ -C, Pro), 23.1 ( $\gamma$ -C, Lys), 21.4 ( $\alpha$ -CH<sub>3</sub>, Pro). EM (ES modo positivo): 501.3 [M+1]<sup>+</sup>.



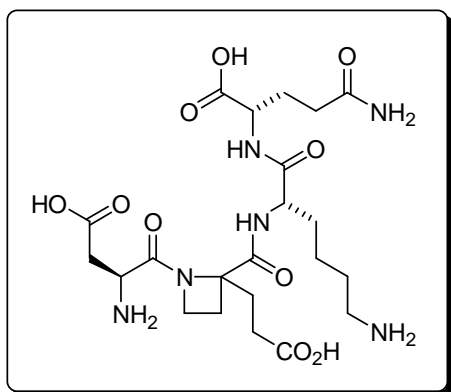
**H-Asp-Azg-Lys-Gln-OH · 2 TFA (48):** Sirupe. Rdto. 62 %. HPLC:  $t_R$  = 3.17 min. (Gradiente de 0 a 100 % de A en B).  $[\alpha]_D$  = -61.08 ( $c$  = 0.86, H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Proporción de rotámeros 1.5:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  8.10 (d, 1H,  $J$  = 7.3, NH-Gln), 8.06 (d, 1H,  $J$  = 7.8, NH-Lys), 7.90 (m, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.29 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 6.79 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 4.70 (m, 1H, H-2), 4.25 (m, 1H,  $\alpha$ -H,

Lys), 4.12 (m, 2H, H-4), 4.10 (m, 2H,  $\alpha$ -H, Asp,  $\alpha$ -H, Gln), 2.73 (m, 3H,  $\beta$ -H, Asp,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.56 (m, 1H,  $\beta$ -H, Asp), 2.46 (m, 1H, H-3), 2.09 (m, 3H,  $\gamma$ -H, Gln, H-3), 1.91 (m, 1H,  $\beta$ -H, Gln), 1.75 (m, 1H,  $\beta$ -H, Gln), 1.63 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.50 (m, 3H,  $\beta$ -H y  $\delta$ -H, Lys), 1.31 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Lys). Rotámero minoritario:  $\delta$  8.34 (d, 1H,  $J$  = 7.5, NH-Gln), 8.30 (d, 1H,  $J$  = 7.3, NH-Lys), 7.90 (m, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.33 (s, 1H, NH-CONH<sub>2</sub>), 6.79 (s, 1H, NH-CONH<sub>2</sub>), 5.06 (m, 1H, H-2), 4.25 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Lys), 4.10 (m, 2H,  $\alpha$ -H, Asp,  $\alpha$ -H, Gln), 3.80 (m, 2H, H-4), 2.73 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.56 (m, 2H,  $\beta$ -H, Asp, H-3), 2.46 (m, 1H,  $\beta$ -H, Asp), 2.09 (m, 3H,  $\gamma$ -H, Gln, H-3), 1.91 (m, 1H,  $\beta$ -H, Gln), 1.75 (m, 1H,  $\beta$ -H, Gln), 1.63 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.50 (m, 3H,  $\beta$ -H y  $\delta$ -H, Lys), 1.31 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Lys). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Rotámero mayoritario:  $\delta$  173.3, 171.3, 171.2, 169.9, 169.2, 167.5 (CO), 60.7 (2-C), 52.5 ( $\alpha$ -C, Lys), 52.2 ( $\alpha$ -C, Asp o  $\alpha$ -C, Gln), 49.0 (4-C), 45.9 ( $\alpha$ -C, Asp o  $\alpha$ -C, Gln), 38.5 ( $\epsilon$ -C, Lys), 36.1 ( $\beta$ -C, Asp), 31.4 ( $\beta$ -C, Lys), 31.3 ( $\gamma$ -C, Gln), 26.8 ( $\beta$ -C, Gln), 26.7 ( $\delta$ -C, Lys), 21.9 ( $\gamma$ -C, Lys), 19.8 (3-C). Rotámero minoritario:  $\delta$  173.7, 171.4, 171.1, 170.6, 168.4, 168.1 (CO), 62.8 (2-C), 52.5 ( $\alpha$ -C, Lys), 52.2 ( $\alpha$ -C, Asp o  $\alpha$ -C, Gln), 49.0 (4-C), 45.9 ( $\alpha$ -C, Asp o  $\alpha$ -C, Gln), 38.7 ( $\epsilon$ -C, Lys), 35.4 ( $\beta$ -C,

Asp), 31.4 ( $\beta$ -C, Lys), 31.3 ( $\gamma$ -C, Gln), 26.8 ( $\beta$ -C, Gln), 26.7 ( $\delta$ -C, Lys), 22.1 ( $\gamma$ -C, Lys), 21.2 (3-C). EM (ES modo positivo): 473.3  $[M+1]^+$ .

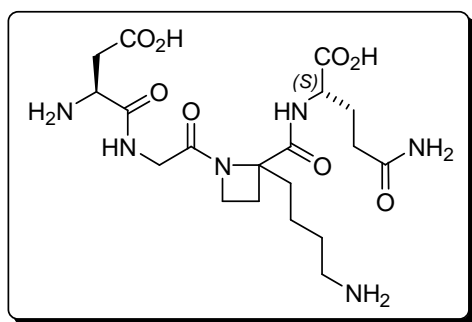
#### 2.6.2.3.4. Síntesis de Asp-Xaa-Yaa-Gln; Xaa= Aze, Glu, Gly. Yaa= Lys, Azk.

*Procedimiento general:* Se acondicionan tres jeringas con 375 mg de resina Wang *N*-Fmoc-Gln(Trt) ( $f=0.59$  mmol de péptido/g de resina). En una de ellas se incorpora Fmoc-Lys(Boc)-OH (310 mg, 0.66 mmol), y en las otras dos Fmoc-Azk(Boc)-OH [(*R,S*)-**60b**, 217 mg, 0.44 mmol]. Seguidamente se incorpora el tercer aminoácido de la secuencia peptídica; Fmoc-Gly-OH (196 mg, 0.66 mmol) o Fmoc-Glu(O<sup>t</sup>Bu)-OH (281 mg, 0.66 mmol) para las resinas que contienen el dipéptido Azk-Gln, y Fmoc-Aze(O<sup>t</sup>Bu)-OH [(*R,S*)-**60c**, 199 mg, 0.44 mmol] en la resina que presenta el dipéptido Lys-Gln. Finalmente, a cada una de las secuencias tripeptídicas se añade Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH (271 mg, 0.66 mmol). Todos los acoplamientos se realizaron según el protocolo 2.6.2.2.1, y los ensayos de ninhidrina resultaron negativos después de un solo acoplamiento. Por el contrario, el correspondiente ensayo de cloranilo tras el acoplamiento sobre Azk resultó positivo, siendo necesario un segundo acoplamiento con las mismas cantidades de reactivos utilizadas en el primer acoplamiento para obtener un resultado negativo del test. Tras la eliminación del grupo Fmoc del extremo *N*-terminal (etapas 1-7 del protocolo 2.6.2.2.1) se deja reaccionar la resina con 2 mL de un cóctel que contiene TFA/EDT/TA/H<sub>2</sub>O/TIS (75:10:10:4:1, v/v/v/v/v) durante 3 h. Transcurrido el tiempo se filtra la resina y se evapora la mezcla de disolventes a sequedad, lavando el crudo con Et<sub>2</sub>O y DCM.



**H-Asp-(*R,S*)-Aze-Lys-Gln-OH · 2 TFA [(*R,S*)-**49**]:** Sirupe. Rdto. 54 %. HPLC:  $t_R$ = 4.00 min. (diastereoisómero minoritario) y 6.56 min. (diastereoisómero mayoritario) (Gradiente de 0 a 100 % de A en B). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): Proporción de diastereoisómeros 1.1:1. Diastereoisómero mayoritario:  $\delta$  8.15 (d, 1H,  $J=8.1$ , NH-Lys), 8.12 (d, 1H,  $J=8.1$ , NH-Gln), 7.84 (m, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.46 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 6.82 (s, 1H,

CONH<sub>2</sub>), 4.27 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Lys), 4.17 (m, 3H,  $\alpha$ -H, Gln, H-4), 4.02 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Asp), 2.76 (m, 3H,  $\epsilon$ -H, Lys,  $\beta$ -H, Asp), 2.61 (dd, 1H,  $J=17.2$ , 5.4,  $\beta$ -H, Asp), 2.46-2.31 (m, 2H, H-3, 2'-H, Aze), 2.29-2.18 (m, 4H, H-3, 1'-H, 2'-H, Aze), 2.11 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Gln), 1.96 (m, 1H,  $\beta$ -H, Gln), 1.79 (m, 1H,  $\beta$ -H, Gln), 1.73-1.49 (m, 4H,  $\beta$ -H y  $\delta$ -H, Lys), 1.32 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Lys), Diastereoisómero minoritario:  $\delta$  8.26 (d, 1H,  $J=7.5$ , NH-Gln), 7.97 (d, 1H,  $J=7.9$ , NH-Lys), 7.84 (m, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.33 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 6.84 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 4.33 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Lys), 4.17 (m, 3H,  $\alpha$ -H, Gln, H-4), 4.02 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Asp), 2.87 (dd, 1H,  $J=17.2$ , 7.5,  $\beta$ -H, Asp), 2.76 (m, 3H,  $\epsilon$ -H, Lys,  $\beta$ -H, Asp), 2.46-2.31 (m, 2H, H-3, 2'-H, Aze), 2.29-2.18 (m, 4H, H-3, 1'-H, 2'-H, Aze), 2.11 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Gln), 1.96 (m, 1H,  $\beta$ -H, Gln), 1.79 (m, 1H,  $\beta$ -H, Gln), 1.73-1.49 (m, 4H,  $\beta$ -H y  $\delta$ -H, Lys), 1.32 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Lys). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  174.9, 174.7, 174.3, 173.9, 173.8, 172.4, 172.0, 171.9, 171.7, 171.5, 169.4, 168.5 (CO), 73.1 y 72.9 (2-C), 53.1 y 52.8 ( $\alpha$ -C, Lys), 52.4 y 52.2 ( $\alpha$ -C, Gln), 47.1 (4-C), 46.7 y 46.3 ( $\alpha$ -C, Asp), 39.3 y 38.6 ( $\epsilon$ -C, Lys), 36.8 y 35.3 ( $\beta$ -C, Asp), 32.2 y 31.9 ( $\gamma$ -C, Gln), 31.6 y 31.5 ( $\beta$ -C, Lys), 30.3 y 29.8 (2'-C, Aze), 28.9 y 28.8 (1'-C, Aze), 27.6 y 27.3 ( $\beta$ -C, Gln), 27.1 ( $\delta$ -C, Lys), 24.9 (3-C), 22.6 y 22.3 ( $\gamma$ -C, Lys). EM (ES modo positivo): 545.3 [M+1]<sup>+</sup>.

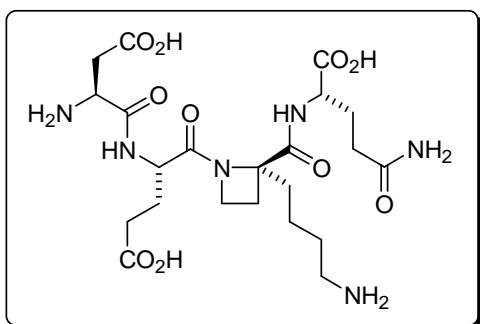


**H-Asp-Gly-(*R,S*)-Azk-Gln-OH · 2 TFA**

**[(*R,S*)-52]:** Sólido céreo. Rdto. 66 %. HPLC:  $t_R$  = 4.96 min. (Gradiente de 0 a 100 % de A en B, diastereoisómero minoritario) y 5.92 min. (Gradiente de 0 a 100 % de A en B, diastereoisómero mayoritario). <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Proporción de

diastereoisómeros 2:1. Diastereoisómero mayoritario:  $\delta$  8.70 (t, 1H,  $J=5.1$ , NH-Gly), 8.32 (d, 1H,  $J=7.6$ , NH-Gln), 7.88 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.34 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 6.82 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 4.16 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gln), 4.12 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Asp), 4.00 (m, 2H, H-4), 3.84 (m, 2H,  $\alpha$ -H, Gly), 2.82 (m, 1H,  $\beta$ -H, Asp), 2.76 (m, 2H, 4'-H, Azk), 2.72 (m, 1H,  $\beta$ -H, Asp), 2.39 (m, 1H, H-3), 2.15 (m, 1H, H-3), 2.08 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Gln), 1.94 (m, 3H, 1'-H, Azk,  $\beta$ -H, Gln), 1.78 (m, 1H,  $\beta$ -H, Gln), 1.52 (m, 2H, 3'-H, Azk), 1.40 (m, 1H, 2'-H, Azk), 1.25 (m, 1H, 2'-H, Azk), Diastereoisómero minoritario:  $\delta$  8.75 (m, 1H, NH-Gly), 8.36 (d, 1H,  $J=7.6$ ,

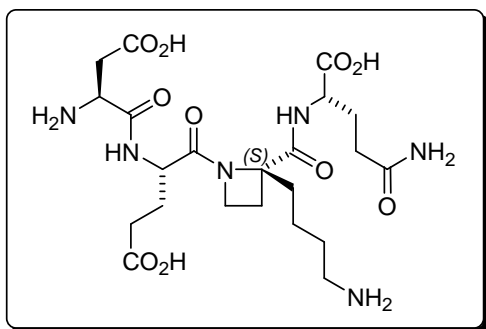
NH-Gln), 7.88 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.36 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 6.83 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 4.16 (m, 1H, α-H, Gln), 4.12 (m, 1H, α-H, Asp), 4.00 (m, 2H, H-4), 3.84 (m, 1H, α-H, Gly), 2.82 (m, 1H, β-H, Asp), 2.76 (m, 2H, 4'-H, Azk), 2.72 (m, 1H, β-H, Asp), 2.44 (m, 1H, H-3), 2.15 (m, 1H, H-3), 2.08 (m, 2H, γ-H, Gln), 1.94 (m, 3H, 1'-H, Azk, β-H, Gln), 1.78 (m, 1H, β-H, Gln), 1.52 (m, 2H, 3'-H, Azk), 1.40 (m, 1H, 2'-H, Azk), 1.25 (m, 1H, 2'-H, Azk). <sup>13</sup>C RMN (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Diastereoisómero mayoritario: δ 173.9, 173.0, 172.1, 171.2, 171.1, 168.2 (CO), 73.1 (2-C), 51.8 (α-C, Gln), 49.0 (α-C, Asp), 45.7 (4-C), 39.8 (α-C, Gly), 38.8 (4'-C, Azk), 35.7 (β-C, Asp), 33.3 (1'-C, Azk), 31.1 (γ-C, Gln), 27.1 (3'-C, Azk), 27.0 (β-C, Gln), 24.4 (3-C), 19.8 (2'-C, Azk), Diastereoisómero minoritario: δ 173.8, 173.0, 172.5, 171.2, 170.7, 168.3 (CO), 73.9 (2-C), 51.9 (α-C, Gln), 49.0 (α-C, Asp), 45.5 (4-C), 41.0 (α-C, Gly), 38.7 (4'-C, Azk), 35.6 (β-C, Asp), 33.7 (1'-C, Azk), 31.2 (γ-C, Gln), 27.1 (3'-C, Azk), 26.7 (β-C, Gln), 24.1 (3-C), 19.7 (2'-C, Azk). EM (ES modo positivo): 473.2 [M+1]<sup>+</sup>.



**H-Asp-Glu-(R)-Azk-Gln-OH · 2 TFA**

**[(R)-53]:** Sirupe. Rdto. 29 %. HPLC: t<sub>R</sub>= 6.60 min. (Gradiente de 0 a 20 % de A en B, ACE 5). <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.79 (d, 2H, J=6.6, NH-Glu), 8.17 (d, 1H, J=7.1, NH-Gln), 7.75 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.41 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 6.90 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 4.26 (m, 1H, α-H, Glu), 4.14 (m,

1H, α-H, Gln), 4.09 (m, 1H, α-H, Asp), 4.05 (m, 2H, H-4), 2.77 (m, 3H, β-H, Asp, 4'-H, Azk), 2.63 (dd, 1H, J=17.8, 9.3, β-H, Asp), 2.30 (m, 3H, H-3, γ-H, Glu), 2.22 (m, 1H, H-3), 2.08 (m, 2H, γ-H, Gln), 1.95 (m, 3H, β-H, Gln, 1'-H, Azk), 1.83 (m, 2H, β-H, Glu, β-H, Gln), 1.72 (m, 1H, β-H, Glu), 1.55 (m, 2H, 3'-H, Azk), 1.45 (m, 1H, 2'-H, Azk), 1.22 (m, 1H, 2'-H, Azk). <sup>13</sup>C RMN (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 174.1, 173.9, 173.1, 173.0, 171.9, 170.6, 168.4 (CO), 73.2 (2-C), 52.3 (α-C, Gln), 49.0 (α-C, Asp), 48.5 (α-C, Glu), 46.3 (4-C), 38.7 (4'-C, Azk), 35.7 (β-C, Asp), 33.5 (1'-C, Azk), 31.3 (γ-C, Gln), 29.6 (γ-C, Glu), 27.2 (3'-C, Azk), 26.0 (β-C, Glu o β-C, Gln), 25.7 (β-C, Glu o β-C, Gln), 23.9 (3-C), 20.0 (2'-C, Azk). EM (ES modo positivo): 545.3 [M+1]<sup>+</sup>.



#### H-Asp-Glu-(S)-Azk-Gln-OH · 2 TFA

[(S)-53]: Sirupe. Rdto. 19 %. HPLC:  $t_R$ = 10.82 min. (Gradiente de 0 a 20 % de A en B, ACE 5).  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8.79 (d, 2H,  $J$ =6.6, NH-Glu), 8.32 (d, 1H,  $J$ =7.8, NH-Gln), 7.75 (s a, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.24 (s, 1H, CONH $_2$ ), 6.80 (s, 1H, CONH $_2$ ), 4.26 (m, 1H,  $\alpha$ -H,

Glu), 4.19 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gln), 4.09 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Asp), 4.05 (m, 2H, H-4), 2.77 (m, 4H,  $\beta$ -H, Asp, 4'-H, Azk), 2.50 (m, 1H, H-3), 2.30 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Glu), 2.08 (m, 3H, H-3,  $\gamma$ -H, Gln), 1.95 (m, 3H,  $\beta$ -H, Gln, 1'-H, Azk), 1.83 (m, 1H,  $\beta$ -H, Glu), 1.72 (m, 2H,  $\beta$ -H, Glu,  $\beta$ -H, Gln), 1.55 (m, 2H, 3'-H, Azk), 1.35 (m, 1H, 2'-H, Azk), 1.22 (m, 1H, 2'-H, Lys).  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz, DMSO- $d_6$ ): Diastereoisómero minoritario:  $\delta$  174.0, 173.9, 173.3, 172.5, 171.4, 171.1, 167.9 (CO), 73.7 (2-C), 51.7 ( $\alpha$ -C, Gln), 48.9 ( $\alpha$ -C, Asp), 48.4 ( $\alpha$ -C, Glu), 46.3 (4-C), 38.7 (4'-C, Azk), 35.5 ( $\beta$ -C, Asp), 33.4 (1'-C, Azk), 31.0 ( $\gamma$ -C, Gln), 29.6 ( $\gamma$ -C, Glu), 27.3 (3'-C, Azk), 26.2 ( $\beta$ -C, Glu o  $\beta$ -C, Gln), 25.8 ( $\beta$ -C, Glu o  $\beta$ -C, Gln), 23.5 (3-C), 19.5 (2'-C, Azk). EM (ES modo positivo): 545.3  $[\text{M}+1]^+$ .

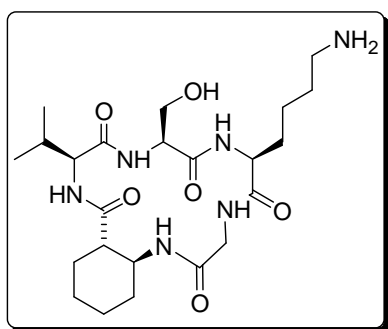
#### 2.6.2.4. Síntesis en fase sólida de miméticos de BDNF.

##### 2.6.2.4.1. Síntesis de péptidos cíclicos miméticos del loop 2 de BDNF.

##### 2.6.2.4.1.1. Síntesis de ciclo(Val-Ser-Lys-Xaa-Yaa); Xaa= Gly, $\beta$ Ala. Yaa= Azg, BAc $_6$ .

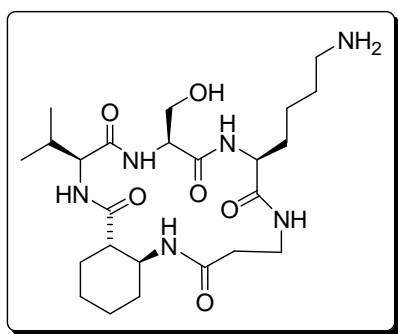
*Procedimiento general:* 1 gramo de resina Wang ( $f$ =0.6-1.0 mmol de OH/g de resina) se hace reaccionar con DSC (1.54 g, 6 mmol) y DMAP (73 mg, 0.6 mmol) bajo atmósfera de argón durante 2 h. Transcurrido el tiempo se añade Fmoc-Lys-OAl (3.13 g, 6.0 mmol) y DIEA (1.55 mL, 12.02 mmol) y se deja reaccionar bajo argón según el protocolo descrito en el apartado 2.6.2.2.2.1. Finalizado el anclaje del aminoácido lisina a la resina se determina el nuevo grado de funcionalización de la resina mediante el ensayo de Gisin descrito en el apartado 2.6.2.2.1.3, obteniendo una funcionalización de 0.33 mmol de péptido/g de resina.

A continuación, se procede a la incorporación de los aminoácidos Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH (380 mg, 0.99 mmol) y Fmoc-Val-OH (336 mg, 0.99 mmol) mediante el procedimiento descrito en el apartado 2.6.2.2.2. Seguidamente, se divide la resina en 2 partes iguales a las que se incorpora Fmoc-BAC<sub>6</sub>c-OH (179 mg, 0.49 mmol) y Fmoc-Azg-OH (158 mg, 0.49 mmol), respectivamente. Cada una de estas resinas se dividen en otras dos partes idénticas y a una parte se le acopla el aminoácido Fmoc-Gly-OH (74 mg, 0.25 mmol) y a la otra Fmoc-βAla-OH (77 mg, 0.25 mmol). Todos los acoplamiento se realizaron según el protocolo 2.6.2.2.2, siendo el ensayo de ninhidrina negativo después de un solo acoplamiento para acoplamiento sobre NHs primarios. Sin embargo, el ensayo de *p*-nitrofenilester llevado a cabo en la reacción de acoplamiento del Azg-derivado dio resultados ambiguos, por lo que se procedió a un segundo acoplamiento utilizando las mismas cantidades de reactivos iniciales. A continuación se eliminó el grupo protector alilo siguiendo el protocolo 2.6.2.2.3, seguido de eliminación del grupo Fmoc y ciclación intramolecular según el protocolo 2.6.2.2.4, obteniéndose también resultados negativos en los tests de ninhidrina en todos los casos. Para el desanclaje de estos péptidos, unos 300 mg de resina seca se añaden a 3 mL de una disolución que contiene TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95:2.5:2.5, v/v/v) y se deja reaccionar durante 1 h y 30 min. Transcurrido ese tiempo, se añade un gran exceso de *tert*-butilmetileter frío (al menos 80 % de volumen final). La disolución se centrifuga y el sobrenadante se elimina por decantación, repitiendo 3 veces el proceso. Tras secar la resina se extrae el crudo con ácido acético al 10 % y se liofiliza el residuo obtenido, purificándose el crudo de reacción obtenido mediante cromatografía en HPLC preparativo.



**Ciclo[Val-Ser-Lys-Gly-(1S,2S)-BAC<sub>6</sub>c] · TFA (70):** Sólido amorfo (56 % Rdto., 97 % pureza). HPLC:  $t_R$  = 5.45 min (5 a 40 % de A en B). <sup>1</sup>H RMN (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1): δ 8.84 (d, 1H, *J*=7.0, NH-Lys), 8.38 (d, 1H, *J*=7.9, NH-Val), 8.35 (d, 1H, *J*=7.4, NH-Ser), 8.30 (m, 1H, NH-Gly), 7.60 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>-Lys), 7.54 (d, 1H, *J*=8.3, NH-BAC<sub>6</sub>c), 4.33 (m, 1H, α-H, Ser), 4.16 (m, 1H, α-H, Lys), 4.09 (t, 1H, *J*=7.9, α-H, Val), 3.95 (dd, 1H, *J*=11.4, 5.7, β-H, Ser), 3.93 (dd,

1H,  $J=16.6$ , 5.7,  $\alpha$ -H, Gly), 3.88 (dd, 1H,  $J=11.4$ , 5.7,  $\beta$ -H, Ser), 3.82 (dd, 1H,  $J=16.6$ , 6.6,  $\alpha$ -H, Gly), 3.79 (m, 1H,  $\beta$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 2.99 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.54 (td, 1H,  $J=11.6$ , 3.5,  $\alpha$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 2.10 (m, 1H,  $\beta$ -H, Val), 2.05 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 2.00 (m, 1H,  $\phi$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.92 (m, 1H,  $\gamma$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.86 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.76 (m, 2H,  $\delta$ -H, y  $\epsilon$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.69 (m, 2H,  $\delta$ -H, Lys), 1.48 (m, 1H,  $\phi$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.46 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.40 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.32 (m, 1H,  $\delta$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.29 (m, 2H,  $\gamma$ -H y  $\epsilon$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 0.97 (d, 3H,  $J=6.6$ ,  $\gamma$ -H, Val), 0.96 (d, 3H,  $J=6.6$ ,  $\gamma$ -H, Val). EM (MALDI-TOF): 497.2 [M+1]<sup>+</sup>, 519.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 535.1 [M+K]<sup>+</sup>.



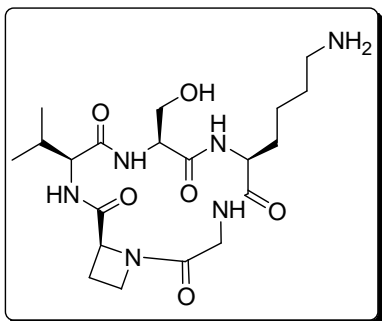
**Ciclo[Val-Ser-Lys-βAla-(1S,2S)-BAc<sub>6</sub>c] · TFA**

**(71):** Sólido amorfo (28 % Rdto., 96 % pureza).

HPLC:  $t_R$  = 4.95 min (5 a 40 % de A en B).

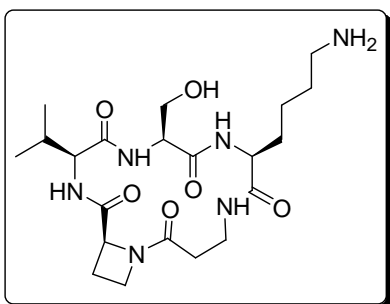
<sup>1</sup>H RMN (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1):  $\delta$  8.59 (d, 1H,  $J=6.1$ , NH-Ser), 8.50 (d, 1H,  $J=6.6$ , NH-Lys), 8.13 (d, 1H,  $J=6.1$ , NH-Val), 8.02 (d, 1H,  $J=9.2$ , NH-BAc<sub>6</sub>c), 7.67 (t, 1H,  $J=5.3$ , NH-βAla), 7.59 (m, 2H, NH<sub>2</sub>-Lys), 4.14 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ser), 4.03 (t,

1H,  $J=6.1$ ,  $\alpha$ -H, Val), 3.97 (dd, 1H,  $J=11.4$ , 5.3,  $\beta$ -H, Ser), 3.89 (c, 1H,  $J=6.6$ ,  $\alpha$ -H, Lys), 3.87 (dd, 1H,  $J=11.4$ , 5.3,  $\beta$ -H, Ser), 3.82 (m, 1H,  $\beta$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 3.56 (m, 1H,  $\beta$ -H, βAla), 3.28 (m, 1H,  $\beta$ -H, βAla), 2.98 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.49 (m, 1H,  $\alpha$ -H, βAla), 2.44 (m, 2H,  $\alpha$ -H, βAla,  $\alpha$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 2.24 (m, 1H,  $\beta$ -H, Val), 1.97 (m, 2H,  $\beta$ -H, Lys), 1.94 (m, 1H,  $\phi$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.92 (m, 1H,  $\gamma$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.74 (m, 2H,  $\delta$ -H, y  $\epsilon$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.67 (m, 2H,  $\delta$ -H, Lys), 1.46 (m, 1H,  $\phi$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.42 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.36 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.31 (m, 1H,  $\delta$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.24 (m, 1H,  $\epsilon$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.19 (m, 1H,  $\gamma$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.01 (d, 3H,  $J=6.6$ ,  $\gamma$ -H, Val), 0.98 (d, 3H,  $J=6.6$ ,  $\gamma$ -H, Val). EM (MALDI-TOF): 511.2 [M+1]<sup>+</sup>, 533.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 549.1 [M+K]<sup>+</sup>.



**Ciclo(Val-Ser-Lys-Gly-Azg) · TFA (72):** Sólido amorfo (17 % Rdto., 95 % pureza). HPLC:  $t_R$  = 3.06 min (5 a 40 % de A en B).  $^1\text{H}$  RMN (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1): Proporción de rotámeros 1.1:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  9.03 (d, 1H,  $J$ =8.8, NH-Val), 8.75 (m, 1H, NH-Ser), 7.97 (m, 1H, NH-Lys), 7.82 (m, 1H, NH-Gly), 7.60 (s a, 2H,  $\text{NH}_2$ -Lys), 5.14 (m, 1H, H-2), 4.31 (m, 1H,  $\alpha$ -H,

Lys), 4.26 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ser), 4.08 (m, 1H, H-4), 4.01 (m, 1H, H-4), 3.99 (m, 2H,  $\beta$ -H, Ser), 3.93 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Val), 3.90 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gly), 3.62 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gly), 2.98 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.79 (m, 1H, H-3), 2.45 (m, 1H,  $\beta$ -H, Val), 2.31 (m, 1H, H-3), 1.90 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.83 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.68 (m, 2H,  $\delta$ -H, Lys), 1.44 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.40 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.04 (m, 3H,  $\gamma$ -H, Val), 1.01 (m, 3H,  $\gamma$ -H, Val), Rotámero minoritario:  $\delta$  8.78 (m, 1H, NH-Gly), 8.33 (d, 1H,  $J$ =6.6, NH-Ser), 8.00 (d, 1H,  $J$ =8.8, NH-Lys), 7.96 (m, 1H, NH-Val), 7.59 (s a, 2H,  $\text{NH}_2$ -Lys), 4.76 (m, 1H, H-2), 4.51 (m, 1H, H-4), 4.37 (m, 1H, H-4), 4.36 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Lys), 4.27 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ser), 4.26 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Val), 4.02 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gly), 3.92 (m, 2H,  $\beta$ -H, Ser), 3.49 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gly), 2.98 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.77 (m, 1H, H-3), 2.33 (m, 1H, H-3), 2.30 (m, 1H,  $\beta$ -H, Val), 1.80 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.73 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.68 (m, 2H,  $\delta$ -H, Lys), 1.45 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.39 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.05 (m, 3H,  $\gamma$ -H, Val), 1.00 (m, 3H,  $\gamma$ -H, Val). EM (MALDI-TOF): 455.2  $[\text{M}+1]^+$ , 477.2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 493.1  $[\text{M}+\text{K}]^+$ .

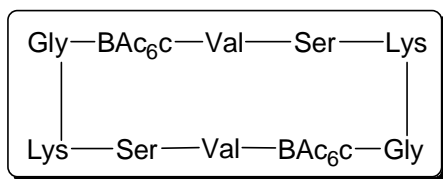


**Ciclo(Val-Ser-Lys- $\beta$ Ala-Azg) · TFA (73):** Sólido amorfo (40 % Rdto., 96 % pureza). HPLC:  $t_R$  = 2.77 min (5 a 40 % de A en B).  $^1\text{H}$  RMN (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1): Proporción de rotámeros 6:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  9.37 (d, 1H,  $J$ =7.0, NH-Val), 8.45 (d, 1H,  $J$ =5.7, NH-Ser), 7.84 (d, 1H,  $J$ =8.3, NH-Lys), 7.61 (s a, 2H,  $\text{NH}_2$ -Lys), 7.08 (t, 1H,  $J$ =7.9, NH- $\beta$ Ala), 5.11 (m, 1H, H-2), 4.30

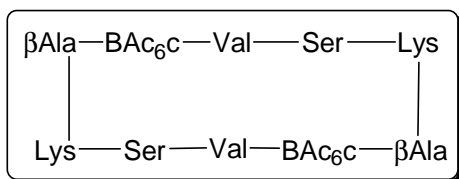
(m, 2H,  $\alpha$ -H, Ser,  $\alpha$ -H, Lys), 4.03 (m, 2H,  $\beta$ -H, Ser), 4.01 (m, 1H, H-4), 3.98 (m, 1H,  $\beta$ -H,  $\beta$ Ala), 3.94 (m, 1H, H-4), 3.76 (t, 1H,  $J$ =7.0,  $\alpha$ -H, Val), 3.08 (m, 1H,  $\beta$ -H,  $\beta$ Ala),



2.99 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.70 (m, 1H, H-3), 2.49 (m, 1H,  $\beta$ -H, Val), 2.30 (m, 1H,  $\alpha$ -H,  $\beta$ Ala), 2.25 (m, 1H, H-3), 2.20 (m, 1H,  $\alpha$ -H,  $\beta$ Ala), 1.94 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.78 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.68 (m, 2H,  $\delta$ -H, Lys), 1.49 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.42 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.09 (d, 3H,  $J=6.6$ ,  $\gamma$ -H, Val), 0.99 (d, 3H,  $J=6.6$ ,  $\gamma$ -H, Val), Rotámero minoritário:  $\delta$  8.73 (d, 1H,  $J=7.0$ , NH-Val), 8.53 (d, 1H,  $J=7.4$ , NH-Lys), 8.48 (d, 1H,  $J=7.0$ , NH-Ser), 7.86 (m, 1H, NH- $\beta$ Ala), 7.60 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>-Lys), 5.11 (m, 1H, H-2), 4.38 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ser), 4.25 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Lys), 4.02 (m, 1H, H-4), 3.97 (m, 1H,  $\beta$ -H, Ser), 3.94 (m, 1H, H-4), 3.92 (m, 1H,  $\beta$ -H, Ser), 3.89 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Val), 3.66 (m, 1H,  $\beta$ -H,  $\beta$ Ala), 3.30 (m, 1H,  $\beta$ -H,  $\beta$ Ala), 2.98 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.70 (m, 2H, H-3), 2.58 (m, 1H,  $\alpha$ -H,  $\beta$ Ala), 2.30 (m, 1H,  $\alpha$ -H,  $\beta$ Ala), 2.23 (m, 1H,  $\beta$ -H, Val), 2.00 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.78 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.68 (m, 2H,  $\delta$ -H, Lys), 1.45 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.38 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.00 (d, 3H,  $J=6.6$ ,  $\gamma$ -H, Val), 0.96 (d, 3H,  $J=6.6$ ,  $\gamma$ -H, Val). EM (MALDI-TOF): 469.3 [M+1]<sup>+</sup>, 491.3 [M+Na]<sup>+</sup>, 507.2 [M+K]<sup>+</sup>.



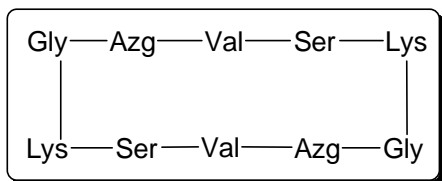
**Ciclo[Val-Ser-Lys-Gly-(1S,2S)-BAC<sub>6</sub>c]<sub>2</sub> · 2 TFA (99):** Sólido amorfo (6 % Rdto., 90 % pureza). HPLC:  $t_R$  = 7.22 min (5 a 40 % de A en B). EM (MALDI-TOF): 993.2 [M+1]<sup>+</sup>, 1015.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 1031.1 [M+K]<sup>+</sup>.



**Ciclo[Val-Ser-Lys- $\beta$ Ala-(1S,2S)-BAC<sub>6</sub>c]<sub>2</sub> · 2 TFA (100):** Sólido amorfo (4 % Rdto., 85 % pureza). HPLC:  $t_R$  = 8.47 min (5 a 40 % de A en B). <sup>1</sup>H RMN (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1):  $\delta$  8.52 (d, 1H,  $J=7.0$ ,

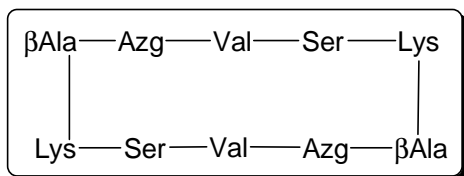
NH-Ser), 8.49 (d, 1H,  $J=7.4$ , NH-Lys), 8.32 (d, 1H,  $J=8.8$ , NH-Val), 8.13 (m, 1H, NH- $\beta$ Ala), 8.09 (d, 1H,  $J=9.2$ , NH-BAC<sub>6</sub>c), 7.62 (m, 2H, NH<sub>2</sub>-Lys), 4.57 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ser), 4.34 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Lys), 4.27 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Val), 3.83 (m, 1H,  $\beta$ -H, BAC<sub>6</sub>c), 3.80 (m, 1H,  $\beta$ -H, Ser), 3.75 (m, 1H,  $\beta$ -H, Ser), 3.58 (m, 1H,  $\beta$ -H,  $\beta$ Ala), 3.12 (m, 1H,  $\beta$ -H,  $\beta$ Ala), 2.99 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.42 (m, 1H,  $\alpha$ -H,  $\beta$ Ala), 2.39 (m, 1H,  $\alpha$ -H, BAC<sub>6</sub>c), 2.29 (m, 1H,  $\alpha$ -H,  $\beta$ Ala), 2.04 (m, 1H,  $\beta$ -H, Val), 1.94 (m, 1H,  $\phi$ -H, BAC<sub>6</sub>c), 1.89 (m, 1H,  $\gamma$ -H, BAC<sub>6</sub>c), 1.80 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.75 (m, 1H,  $\delta$ -H y  $\epsilon$ -H, BAC<sub>6</sub>c), 1.72 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.68

(m, 2H,  $\delta$ -H, Lys), 1.47 (m, 1H,  $\phi$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.45 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.39 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.34 (m, 1H,  $\delta$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.24 (m, 1H,  $\epsilon$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.23 (m, 1H,  $\gamma$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 0.92 (m, 6H,  $\gamma$ -H, Val). EM (MALDI-TOF): 1021.4 [M+1]<sup>+</sup>, 1043.3 [M+Na]<sup>+</sup>, 1059.3 [M+K]<sup>+</sup>.



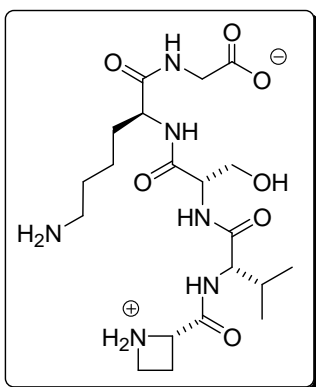
**Ciclo(Val-Ser-Lys-Gly-Azg)<sub>2</sub> · 2 TFA (101):**

Sólido amorfo (3 % Rdto., 96 % pureza). HPLC:  $t_R$  = 4.49 min (5 a 40 % de A en B). EM (MALDI-TOF): 909.2 [M+1]<sup>+</sup>, 931.2 [M+Na]<sup>+</sup>, 947.2 [M+K]<sup>+</sup>.



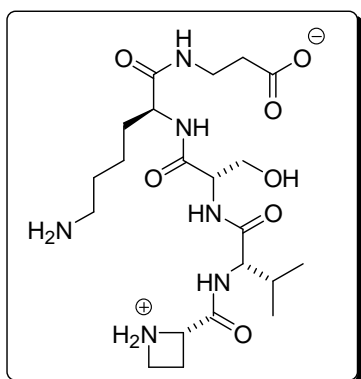
**Ciclo(Val-Ser-Lys-βAla-Azg)<sub>2</sub> · 2 TFA (102):**

Sólido amorfo (5 % Rdto., 96 % pureza). HPLC:  $t_R$  = 3.62 min (5 a 40 % de A en B). EM (MALDI-TOF): 937.3 [M+1]<sup>+</sup>, 959.3 [M+Na]<sup>+</sup>, 961.3 [M+K]<sup>+</sup>.



**H-Azg-Val-Ser-Lys-Gly-OH · 2 TFA (105):**

<sup>1</sup>H RMN (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1):  $\delta$  8.92 (m, 1H, NH<sub>2</sub>-Azg), 8.73 (d, 1H,  $J$ =7.0, NH-Ser), 8.69 (d, 1H,  $J$ =7.0, NH-Lys), 8.66 (m, 1H, NH<sub>2</sub>-Azg), 8.65 (d, 1H,  $J$ =7.0, NH-Val), 8.37 (t, 1H,  $J$ =5.7, NH-Gly), 7.60 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>-Lys), 5.16 (m, 1H, H-2), 4.50 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ser), 4.37 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Lys), 4.19 (t, 1H,  $J$ =7.0,  $\alpha$ -H, Val), 4.17 (m, 1H, H-4), 4.02 (m, 1H, H-4), 3.87 (m, 2H,  $\beta$ -H, Ser), 3.86 (m, 2H,  $\alpha$ -H, Gly), 2.99 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.87 (m, 1H, H-3), 2.58 (m, 1H, H-3), 2.07 (m, 1H,  $\beta$ -H, Val), 1.89 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.78 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.69 (m, 2H,  $\delta$ -H, Lys), 1.48 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.46 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 0.95 (d, 6H,  $J$ =7.0,  $\gamma$ -H y  $\gamma$ -H Val). EM (MALDI-TOF): 473.5 [M+1]<sup>+</sup>.



**H-Azg-Val-Ser-Lys-βAla-OH · 2 TFA (106):**

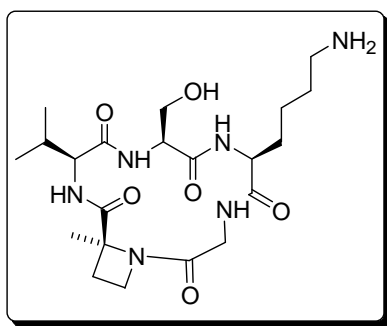
$^1\text{H}$  RMN (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1):  $\delta$  8.91 (m, 2H,  $\text{NH}_2\text{-Azg}$ ), 8.72 (m, 1H, NH-Ser), 8.65 (m, 1H, NH-Val), 8.63 (m, 1H, NH-Lys), 8.28 (m, 1H, NH-βAla), 7.60 (s a, 2H,  $\text{NH}_2\text{-Lys}$ ), 5.17 (m, 1H, H-2), 4.48 (m, 1H,  $\alpha\text{-H}$ , Ser), 4.25 (m, 1H,  $\alpha\text{-H}$ , Lys), 4.19 (m, 1H,  $\alpha\text{-H}$ , Val), 4.17 (m, 1H, H-4), 4.01 (m, 1H, H-4), 3.86 (m, 2H,  $\beta\text{-H}$ , Ser), 3.49 (m, 1H,  $\beta\text{-H}$ , βAla), 3.42 (m, 1H,  $\beta\text{-H}$ , βAla), 2.99 (m, 2H,  $\epsilon\text{-H}$ , Lys), 2.83 (m, 1H, H-3), 2.57 (m, 1H, H-3), 2.56 (m, 2H,  $\alpha\text{-H}$ , βAla), 2.07 (m, 1H,  $\beta\text{-H}$ , Val), 1.82 (m, 1H,  $\beta\text{-H}$ , Lys), 1.73 (m, 1H,  $\beta\text{-H}$ , Lys), 1.67 (m, 2H,  $\delta\text{-H}$ , Lys), 1.44 (m, 1H,  $\gamma\text{-H}$ , Lys), 1.38 (m, 1H,  $\gamma\text{-H}$ , Lys), 0.96 (m, 3H,  $\gamma\text{-H}$ , Val), 0.95 (m, 3H,  $\gamma\text{-H}$ , Val). EM (MALDI-TOF): 469.3  $[\text{M}+1]^+$ , 491.3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 507.2  $[\text{M}+\text{K}]^+$ .

**2.6.2.4.1.2. Síntesis de ciclo(Val-Ser-Lys-Xaa-Aza); Xaa= Gly, βAla.**

*Procedimiento general:* 1 gramo de resina Wang ( $f=0.6\text{-}1.0$  mmol de OH/g de resina) se deja reaccionar con DSC (1.54 g, 6 mmol) y DMAP (73 mg, 0.6 mmol) bajo argón durante un periodo de 2 h. Transcurrido este tiempo se añade Fmoc-Lys-OAl (3.13 g, 6.0 mmol) y DIEA (1.55 mL, 12.02 mmol) y se deja reaccionar en atmósfera inerte 4 h, según viene descrito en el apartado 2.6.2.2.2.1. Finalizado el anclaje del residuo de lisina a la resina se determina el nuevo grado de funcionalización de la resina mediante el ensayo de Gisin descrito en el apartado 2.6.2.2.1.3, obteniendo una funcionalización de 0.24 mmol de péptido/g de resina.

Tras la eliminación del grupo Fmoc, se incorporan los aminoácidos Fmoc-Ser( $^t\text{Bu}$ )-OH (276 mg, 0.72 mmol), Fmoc-Val-OH (244 mg, 0.72 mmol) y Aza (274 mg, 0.72 mmol) sucesivamente mediante el procedimiento descrito en el apartado 2.6.2.2.2.2. A continuación se divide la resina en 2 partes iguales y se elimina el grupo Fmoc, acoplándose a una mitad de la resina Fmoc-Gly-OH (107 mg, 0.36 mmol) y a la otra Fmoc-βAla-OH (112 mg, 0.36 mmol), según el protocolo 2.6.2.2.2.2. La finalización de los acoplamientos se comprobó mediante el ensayo de ninhidrina, en los correspondientes acoplamiento para la incorporación de Ser y Val. Los ensayos de *p*-nitrofeniléster

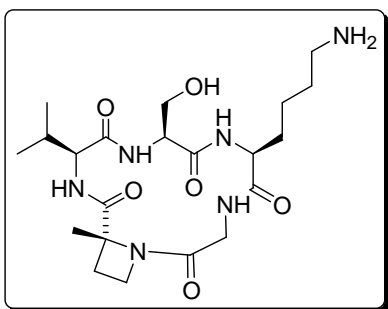
realizados para el acoplamiento sobre Aza resultaron ambiguos, por lo que se realizó un nuevo acoplamiento con la mitad de la cantidad de reactivos iniciales. Tras la eliminación del grupo protector alilo siguiendo el protocolo 2.6.2.2.3, se realizó la ciclación intramolecular descrita en el protocolo 2.6.2.2.4. El test de ninhidrina resultó negativo en todos los casos excepto para la ciclación de ciclo(Val-Ser-Lys-Gly-Aza), por lo que se repitió la reacción de ciclación con un tercio de la cantidad de los reactivos iniciales. Finalmente, la escisión ácida de los péptidos de la resina y posterior lavado y purificación de los compuestos, se realizó de manera idéntica a la descrita en el apartado 2.6.2.4.1.1.



**Ciclo[Val-Ser-Lys-Gly-(S)-Aza] · TFA [(S)-74]:**

Sirupe (10 % Rdto.). HPLC:  $t_R$  = 4.12 min (5 a 40 % de A en B).  $^1\text{H}$  RMN (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1): Proporción de rotámeros 9.3:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  8.75 (t, 1H,  $J$ =5.5, NH-Gly), 8.33 (d, 1H,  $J$ =5.7, NH-Ser), 7.97 (d, 1H,  $J$ =8.8, NH-Lys), 7.89 (d, 1H,  $J$ =9.2, NH-Val), 7.60 (s a, 2H,  $\text{NH}_2$ -Lys), 4.46 (m, 1H, H-4), 4.39 (m, 1H, H-4),

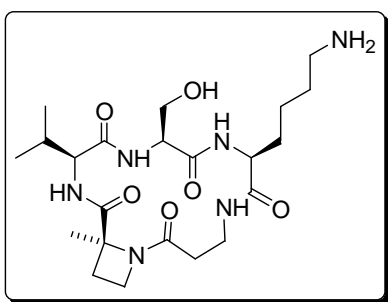
4.36 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Lys), 4.34 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Val), 4.22 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ser), 3.94 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gly), 3.93 (m, 2H,  $\beta$ -H, Ser), 3.49 (dd, 1H,  $J$ =14.5, 5.5,  $\alpha$ -H, Gly), 2.98 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.51 (m, 1H, H-3), 2.37 (m, 1H, H-3), 2.30 (m, 1H,  $\beta$ -H, Val), 1.80 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.73 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.69 (m, 2H,  $\delta$ -H, Lys), 1.68 (s, 3H, 2- $\text{CH}_3$ , Aza), 1.46 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.40 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.06 (d, 3H,  $J$ =7.0,  $\gamma$ -H, Val), 1.00 (d, 3H,  $J$ =6.6,  $\gamma$ -H, Val), Rotámero minoritario:  $\delta$  8.68 (m, 1H, NH-Ser), 8.62 (m, 1H, NH-Val), 8.04 (m, 1H, NH-Gly), 7.95 (d, 1H,  $J$ =7.0, NH-Lys), 7.60 (s a, 2H,  $\text{NH}_2$ -Lys), 4.20 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Val), 4.12 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ser), 4.06 (m, 2H,  $\alpha$ -H, Lys, H-4), 4.03 (m, 1H,  $\beta$ -H, Ser), 4.01 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gly), 3.99 (m, 1H, H-4), 3.96 (m, 1H,  $\beta$ -H, Ser), 3.46 (dd, 1H,  $J$ =14.5, 5.7,  $\alpha$ -H, Gly), 3.00 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.58 (m, 1H, H-3), 2.40 (m, 1H, H-3), 2.34 (m, 1H,  $\beta$ -H, Val), 1.93 (m, 2H,  $\beta$ -H, Lys), 1.77 (s, 3H, 2- $\text{CH}_3$ , Aza), 1.71 (m, 2H,  $\delta$ -H, Lys), 1.51 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.03 (d, 3H,  $J$ =6.1,  $\gamma$ -H, Val), 1.02 (d, 3H,  $J$ =6.6,  $\gamma$ -H, Val). EM (MALDI-TOF): 469.2  $[\text{M}+1]^+$ , 491.2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 507.2  $[\text{M}+\text{K}]^+$ .



**Ciclo[Val-Ser-Lys-Gly-(R)-Aza] · TFA [(R)-74]:**

Sirupe (3 % Rdto.). HPLC:  $t_R$  = 4.12 min (5 a 40 % de A en B).  $^1\text{H}$  RMN (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1): Proporción de rotámeros 5:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  8.57 (d, 1H,  $J$ =7.4, NH-Ser), 8.22 (m, 1H, NH-Lys), 8.21 (m, 1H, NH-Val), 8.20 (m, 1H, NH-Gly), 7.61 (s a, 2H,  $\text{NH}_2$ -Lys), 4.28 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Lys), 4.23 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ser), 4.17 (m,

1H,  $\alpha$ -H, Val), 4.13 (m, 2H,  $\alpha$ -H, Gly, H-4), 4.04 (m, 1H, H-4), 4.03 (m, 1H,  $\beta$ -H, Ser), 3.93 (m, 1H,  $\beta$ -H, Ser), 3.58 (dd, 1H,  $J$ =14.7, 3.9,  $\alpha$ -H, Gly), 2.99 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.65 (m, 1H, H-3), 2.27 (m, 1H, H-3), 2.10 (m, 1H,  $\beta$ -H, Val), 1.88 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.83 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.78 (s, 3H, 2- $\text{CH}_3$ , Aza), 1.69 (m, 2H,  $\delta$ -H, Lys), 1.48 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.42 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 0.97 (d, 6H,  $J$ =7.0,  $\gamma$ -H Val). Rotámero minoritario:  $\delta$  8.77 (m, 1H, NH-Ser), 8.71 (m, 1H, NH-Lys), 7.98 (m, 1H, NH-Val), 7.61 (s a, 2H,  $\text{NH}_2$ -Lys), 7.18 (m, 1H, NH-Gly), 4.27 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ser), 4.15 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gly), 4.08 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Lys), 4.02 (m, 1H,  $\beta$ -H, Ser), 3.89 (m, 3H, H-4,  $\alpha$ -H, Val), 3.82 (m, 1H,  $\beta$ -H, Ser), 3.32 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gly), 3.00 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.41 (m, 2H, H-3), 2.40 (m, 1H,  $\beta$ -H, Val), 1.93 (m, 2H,  $\beta$ -H, Lys), 1.91 (s, 3H, 2- $\text{CH}_3$ , Aza), 1.70 (m, 2H,  $\delta$ -H, Lys), 1.51 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.04 (m, 3H,  $\gamma$ -H Val). 0.99 (m, 3H,  $\gamma$ -H Val). EM (MALDI-TOF): 469.2  $[\text{M}+1]^+$ , 491.2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 507.2  $[\text{M}+\text{K}]^+$ .

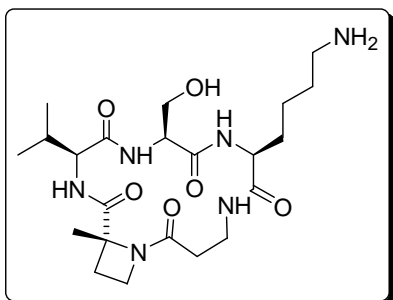


**Ciclo[Val-Ser-Lys-βAla-(S)-Aza] · TFA [(S)-75]:**

Sirupe (6 % Rdto., 97 % pureza). HPLC:  $t_R$  = 4.02 min (5 a 40 % de A en B).  $^1\text{H}$  RMN (600 MHz,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1): Proporción de rotámeros 1.3:1. Rotámero mayoritario:  $\delta$  8.64 (d, 1H,  $J$ =7.9, NH-Lys), 8.48 (d, 1H,  $J$ =7.9, NH-Ser), 8.40 (d, 1H,  $J$ =8.3, NH-Val), 7.88 (m, 1H, NH-βAla), 7.60 (s a, 2H,  $\text{NH}_2$ -Lys), 4.37 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ser), 4.24

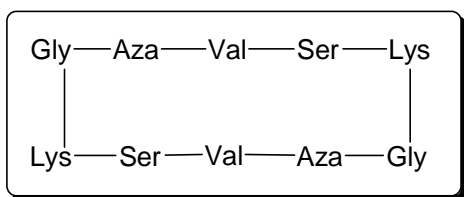
(m, 1H, H-4), 4.18 (m, 1H, H-4), 4.13 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Lys), 4.02 (t, 1H,  $J$ =8.3,  $\alpha$ -H, Val), 3.89 (m, 2H,  $\beta$ -H, Ser), 3.65 (m, 1H,  $\beta$ -H, βAla), 3.27 (m, 1H,  $\beta$ -H, βAla), 2.98 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.51 (m, 1H, H-3), 2.49 (m, 1H,  $\alpha$ -H, βAla), 2.32 (m, 1H,  $\alpha$ -H, βAla), 2.25

(m, 1H, H-3), 2.14 (m, 1H,  $\beta$ -H, Val), 1.98 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.82 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.70 (m, 1H,  $\delta$ -H, Lys), 1.68 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>, Aza), 1.65 (m, 1H,  $\delta$ -H, Lys), 1.45 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.37 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 0.99 (d, 3H,  $J$ =6.6,  $\gamma$ -H, Val), 0.96 (d, 3H,  $J$ =6.6,  $\gamma$ -H, Val), Rotámero minoritario:  $\delta$  8.78 (d, 1H,  $J$ =6.6, NH-Val), 8.66 (d, 1H,  $J$ =5.7, NH-Ser), 7.95 (d, 1H,  $J$ =7.4, NH-Lys), 7.62 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>-Lys), 7.50 (m, 1H, NH- $\beta$ Ala), 4.30 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Lys), 4.21 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ser), 4.07 (dd, 1H,  $J$ =11.8, 4.8,  $\beta$ -H, Ser), 4.03 (dd, 1H,  $J$ =11.8, 4.8,  $\beta$ -H, Ser), 4.00 (m, 1H, H-4), 3.94 (t, 1H,  $J$ =6.6,  $\alpha$ -H, Val), 3.83 (m, 1H, H-4), 3.81 (m, 1H,  $\beta$ -H,  $\beta$ Ala), 3.23 (m, 1H,  $\beta$ -H,  $\beta$ Ala), 2.98 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.54 (m, 1H, H-3), 2.44 (m, 1H,  $\alpha$ -H,  $\beta$ Ala), 2.35 (m, 1H, H-3), 2.33 (m, 1H,  $\beta$ -H, Val), 2.27 (m, 1H,  $\alpha$ -H,  $\beta$ Ala), 1.90 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.80 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>, Aza), 1.74 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.67 (m, 2H,  $\delta$ -H, Lys), 1.44 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.40 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.06 (d, 3H,  $J$ =6.6,  $\gamma$ -H, Val), 1.01 (d, 3H,  $J$ =7.0,  $\gamma$ -H, Val). EM (MALDI-TOF): 483.1 [M+1]<sup>+</sup>, 505.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 521.0 [M+K]<sup>+</sup>.



**Ciclo[Val-Ser-Lys- $\beta$ Ala-(R)-Aza] · TFA [(R)75]:**

Sirupe (6 % Rdto., 97 % pureza), que no pudo ser caracterizado. HPLC:  $t_R$  = 4.62 min (5 a 40 % de A en B). EM (MALDI-TOF): 483.1 [M+1]<sup>+</sup>, 505.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 521.0 [M+K]<sup>+</sup>.



**Ciclo(Val-Ser-Lys-Gly-Aza)<sub>2</sub> · 2 TFA**

**(103a):** Sirupe (5 % Rdto., 88 % pureza).

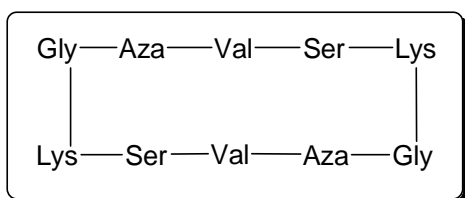
HPLC:  $t_R$  = 4.93 min (5 a 40 % de A en B).

<sup>1</sup>H RMN (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1):

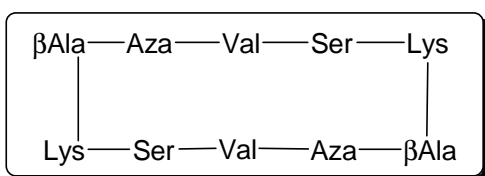
Rotámero mayoritario:  $\delta$  8.65 (m, 1H, NH-

Gly), 8.55 (m, 1H, NH-Ser), 8.43 (m, 1H, NH-Val), 8.28 (m, 1H, NH-Lys), 7.60 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>-Lys), 4.24 (m, 1H, H-4), 4.30 (m, 1H, H-4), 4.48 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Lys), 4.36 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Val), 4.64 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ser), 3.97 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gly), 3.84 (m, 2H,  $\beta$ -H, Ser), 3.68 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Gly), 2.96 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys), 2.58 (m, 1H, H-3), 2.33 (m, 1H, H-3), 2.22 (m,

1H,  $\beta$ -H, Val), 1.85 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.71 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys), 1.66 (m, 2H,  $\delta$ -H, Lys), 1.73 (s, 3H, 2-CH<sub>3</sub>, Aza), 1.39 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 1.34 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys), 0.94 (m, 6H,  $\gamma$ -H, Val). EM (MALDI-TOF): 937.3 [M+1]<sup>+</sup>, 959.3 [M+Na]<sup>+</sup>, 975.2 [M+K]<sup>+</sup>.



**Ciclo(Val-Ser-Lys-Gly-Aza)<sub>2</sub> · 2 TFA (103b):** Sólido amorfo (4 % Rdto., 89 % pureza). HPLC:  $t_R$  = 4.17 min (5 a 40 % de A en B). EM (MALDI-TOF): 937.3 [M+1]<sup>+</sup>, 959.3 [M+Na]<sup>+</sup>, 975.2 [M+K]<sup>+</sup>.



**Ciclo(Val-Ser-Lys- $\beta$ Ala-Aza)<sub>2</sub> · 2 TFA (104):** Sirupe (5 % Rdto.), señal ancha correspondiente a dímero cíclico. HPLC:  $t_R$  = 4.99, 5.30, 5.60 min (5 a 40 % de A en B). EM (MALDI-TOF): 965.1 [M+1]<sup>+</sup>,

987.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 1003.1 [M+K]<sup>+</sup>.

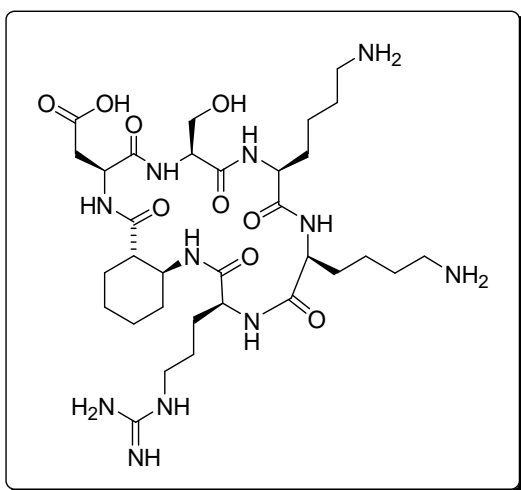
#### 2.6.2.4.2. Síntesis de péptidos cíclicos miméticos del loop 4 de BDNF [ciclo(Asp-Ser-Lys-Lys-Arg-Xaa); Xaa= BAc<sub>6</sub>c, Azg].

*Procedimiento general:* Se hacen reaccionar 500 mg de resina Wang (f=0.6-1.0 mmol de OH/g de resina) con DSC (769 mg, 3 mmol) y DMAP (37 mg, 0.3 mmol) bajo argón durante 2 h. Tras este tiempo se añade Fmoc-Lys-OAl (1.56 g, 3.0 mmol) y DIEA (0.77 mL, 6.01 mmol) y se deja reaccionar bajo atmósfera inerte durante 4 h, según aparece descrito en el apartado 2.6.2.2.2.1. Finalizado el anclaje del residuo de lisina a la resina se determina el nuevo grado de funcionalización de la resina mediante el ensayo de Gisin descrito en el apartado 2.6.2.2.1.3, obteniendo una funcionalización de 0.54 mmol de péptido/g de resina.

A continuación se elimina el grupo Fmoc y se incorporan Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH (299 mg, 0.78 mmol) y Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH (321 mg, 0.78 mmol). A continuación se divide la resina en dos partes iguales, a una de ellas se incorpora Fmoc-Azg-OH (126 mg, 0.39 mmol) y a la otra Fmoc-BAc<sub>6</sub>c-OH (142 mg, 0.39 mmol). Seguidamente, se acoplaron a cada jeringa los aminoácidos restantes, Fmoc-Arg(Pbf)-OH (253 mg, 0.39 mmol) y

Fmoc-Lys(Boc)-OH (182 mg, 0.39 mmol) para obtener las secuencias **90** y **91** mediante el procedimiento descrito en el apartado 2.6.2.2.2. La incorporación de Fmoc-Arg(Pbf)-OH resultó problemática en ambas series, siendo positivos tanto el ensayo de ninhidrina tras acoplamiento sobre BAc<sub>6</sub>c como el de de *p*-nitrofenilester después del acoplamiento sobre Azg, por lo que en ambos casos se repitió el acoplamiento utilizando las mismas cantidades de reactivos iniciales. Además, para la secuencia que contiene un residuo de BAc<sub>6</sub>c **90**, también resultó positivo el ensayo de ninhidrina realizado tras el acoplamiento de Fmoc-Lys(Boc)-OH, realizándose un segundo acoplamiento con la mitad de reactivos de partida. Tras la eliminación del grupo protector alilo siguiendo el protocolo 2.6.2.2.3, se realizó la ciclación intramolecular de acuerdo al protocolo 2.6.2.2.4. El test de ninhidrina resultó positivo para la secuencia **90**, necesitando de un segundo tratamiento con la mitad de reactivos de acoplamiento iniciales.

Finalmente, la escisión ácida de los péptidos de la resina y posterior lavado y purificación de los compuestos, se realizó de manera idéntica a la descrita en el apartado 2.6.2.4.1.1.

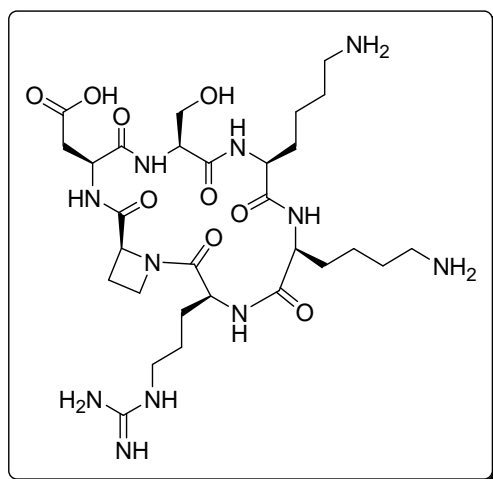


**Ciclo[Asp-Ser-Lys-Lys-Arg-(1S,2S)-BAc<sub>6</sub>c] · 3 TFA (76):** Sólido amorfo (11 % Rdto., 92 % pureza). HPLC:  $t_R$  = 3.24 min (0 a 95 % de A en B). <sup>1</sup>H RMN (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1):  $\delta$  8.49 (m, 1H, NH-Lys3), 8.38 (d, 1H,  $J$ =7.0, NH-Asp), 8.33 (m, 1H, NH-Lys4), 8.18 (s a, 1H, NH-Ser), 7.93 (d, 1H,  $J$ =7.4, NH-Arg), 7.63 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>-Lys4), 7.62 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>-Lys3), 7.56 (d, 1H,  $J$ =6.6, NH-BAc<sub>6</sub>c), 7.29 (t, 1H,  $J$ =5.7, NH- $\epsilon$ Arg), 6.92 (m, 1H, NH<sub>2</sub>-Arg), 6.50 (m, 1H, NH<sub>2</sub>-Arg),

4.59 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Asp), 4.34 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Ser), 4.27 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Lys4), 4.18 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Arg), 4.13 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Lys3), 3.98 (dd, 1H,  $J$ =11.8, 4.8,  $\beta$ -H, Ser), 3.91 (dd, 1H,  $J$ =11.8, 3.9,  $\beta$ -H, Ser), 3.69 (m, 1H,  $\beta$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 3.19 (m, 2H,  $\delta$ -H, Arg), 3.00 (m, 2H,

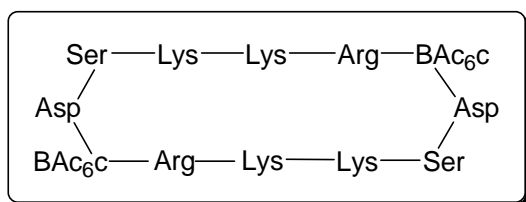


$\epsilon$ -H, Lys4), 2.99 (m, 3H,  $\epsilon$ -H, Lys3,  $\beta$ -H, Asp), 2.83 (dd, 1H,  $J=17.1, 4.4$ ,  $\beta$ -H, Asp), 2.60 (m, 1H,  $\alpha$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.98 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys4), 1.97 (m, 1H,  $\gamma$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.95 (m, 1H,  $\beta$ -H, Arg), 1.89 (m, 2H,  $\beta$ -H, Lys3), 1.88 (m, 1H,  $\phi$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.86 (m, 1H,  $\beta$ -H, Arg), 1.82 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys4), 1.75 (m, 1H,  $\delta$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.73 (m, 1H,  $\epsilon$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.70 (m, 2H,  $\delta$ -H, Lys3), 1.69 (m, 2H,  $\delta$ -H, Lys4), 1.56 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Arg), 1.51 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys3), 1.48 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys4), 1.44 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Lys3,  $\phi$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.42 (m, 2H,  $\gamma$ -H, Lys4,  $\gamma$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.32 (m, 1H,  $\delta$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.23 (m, 1H,  $\epsilon$ -H, BAc<sub>6</sub>c). EM (MALDI-TOF): 740.4 [M+1]<sup>+</sup>, 762.4 [M+Na]<sup>+</sup>, 778.3 [M+K]<sup>+</sup>.



### Ciclo(Asp-Ser-Lys-Lys-Arg-Azg) · 3

**TFA (77):** Sólido amorfo (1 % Rdto., 89 % pureza). HPLC:  $t_R$  = 2.57 min (0 a 95 % de A en B). Debido al bajo rendimiento de obtenido, el compuesto **89** no ha podido ser caracterizado. EM (MALDI-TOF): 698.1 [M+1]<sup>+</sup>, 720.0 [M+Na]<sup>+</sup>, 736.1 [M+K]<sup>+</sup>.



### Ciclo[Asp-Ser-Lys-Lys-Arg-(1S,2S)-BAc<sub>6</sub>c]<sub>2</sub> · 6 TFA (112):

Sólido amorfo (7 % Rdto., 98 % pureza). HPLC:  $t_R$  = 3.44 min (0 a 95 % de A en B). <sup>1</sup>H RMN (600 MHz, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1):  $\delta$  8.55 (m, 1H, NH-Arg), 8.52 (d, 1H,

$J=7.0$ , NH-Lys3), 8.49 (m, 1H, NH-Ser), 8.40 (m, 1H, NH-BAc<sub>6</sub>c), 8.39 (m, 1H, NH-Asp), 8.06 (d, 1H,  $J=6.6$ , NH-Lys4), 7.63 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>-Lys4), 7.61 (s a, 2H, NH<sub>2</sub>-Lys3), 7.21 (m, 1H, NH- $\epsilon$ Arg), 6.91 (s, 1H, NH<sub>2</sub>-Arg), 6.54 (s, 1H, NH<sub>2</sub>-Arg), 4.63 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Asp), 4.36 (m, 1H,  $\alpha$ -H, Lys4), 4.29 (m, 2H,  $\alpha$ -H, Ser,  $\alpha$ -H, Lys3), 4.24 (m,

1H,  $\alpha$ -H, Arg), 4.00 (m, 1H,  $\beta$ -H, Ser), 3.91 (m, 1H,  $\beta$ -H, Ser), 3.81 (m, 1H,  $\beta$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 3.12 (m, 2H,  $\delta$ -H, Arg), 2.99 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys3), 2.97 (m, 2H,  $\epsilon$ -H, Lys4), 2.89 (m, 1H,  $\beta$ -H, Asp), 2.78 (m, 1H,  $\beta$ -H, Asp), 2.46 (m, 1H,  $\alpha$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.92 (m, 1H,  $\gamma$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.90 (m, 1H,  $\phi$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.87 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys3), 1.81 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys3), 1.77 (m, 1H,  $\beta$ -H, Lys4), 1.76 (m, 2H,  $\delta$ -H y  $\epsilon$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.69 (m, 2H,  $\beta$ -H, Arg,  $\beta$ -H, Lys4), 1.68 (m, 2H,  $\delta$ -H, Lys3), 1.67 (m, 2H,  $\delta$ -H, Lys4), 1.65 (m, 1H,  $\beta$ -H, Arg), 1.53 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Arg), 1.48 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Arg), 1.46 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys3), 1.45 (m, 1H,  $\phi$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.39 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys3), 1.38 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys4), 1.36 (m, 1H,  $\delta$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.33 (m, 1H,  $\gamma$ -H, Lys4), 1.22 (m, 1H,  $\gamma$ -H, BAc<sub>6</sub>c), 1.21 (m, 1H,  $\epsilon$ -H, BAc<sub>6</sub>c). EM (MALDI-TOF): 1479.2 [M+1]<sup>+</sup>, 1501.1 [M+Na]<sup>+</sup>, 1518.1 [M+K]<sup>+</sup>.

### **2.6.3. Evaluación de la actividad biológica de los miméticos de BDNF.**

Preparación de cultivos neuronales del hipocampo: Los cultivos primarios de neuronas corticales de ratas se prepararon a partir de embriones de ratas Sprague Dawley en el día 18 de su desarrollo embrionario (E18). Después de eliminar cuidadosamente las meninges, se aisló la corteza cerebral, que se colocó en disolución salina equilibrada de Hank (HBSS), y se incubó con tripsina (0.25 %) y deoxiribonucleasa I (0.10 mg/mL) a 37 °C durante 15 min. A continuación se lavaron las cortezas cerebrales en disolución de HBSS que contiene un 10 % de FCS para inactivar la actividad de tripsina, y tras centrifugación a 140 x g durante 1 min, las células se disgregaron mecánicamente en HBSS. Los cultivos corticales se mantuvieron en medio Neurobasal libre de suero, suplementado con B27, glutamato (25  $\mu$ M), glutamina (0.5 mM) y Pen/Strep. Las células se mantuvieron a 37 °C en un incubador de 5 % CO<sub>2</sub>/95 % aire, durante 7-8 días.

Anticuerpos: Se empleó un anticuerpo Trk específico de fosfato (pY490) purificado por cromatografía de afinidad, que reconoce el péptido sintético correspondiente a los residuos 485 a 493 (IENPQY\*FSD) del receptor TrkA humano, en el que la Tyr490 se encuentra fosforilada. Este anticuerpo está comercializado (New England Biolabs, Beverly, MA). La secuencia está altamente conservada en los tres receptores Trk [TrkA

(MENPQYFSD), TrkB (IENPQYFGI) y TrkC (IENPQYFRQ)], así como en diferentes especies, rata, ratón y humano.

Cultivo celular y análisis de Western Blot: Las neuronas corticales se incubaron durante 7 días, en placas de seis pocillos recubiertas de poli-D-lisina. Para establecer la eficacia de los compuestos como inhibidores de BDNF, se preincubaron con cada compuesto (100  $\mu$ M) o el vehículo durante 1 h, seguido de estimulación con 10 ng/mL de BDNF durante 10 min. A continuación se lavaron las células una vez con PBS a 0 °C, y seguidamente se lisaron en tampón 1x que contiene NaCl (150 mM), EDTA (1 mM), glicerol [0.1 % (v/v)], DTT (100 mM) y un cóctel inhibidor de fosfatasa (10 mg/mL, Sigma) en tampón Tris-HCl (50 mM, pH 8.0). Los extractos se sometieron a SDS-PAGE, y se transfirieron a continuación a una membrana de PVDF (Millipore). Las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con Tween 20 [0.1 % (v/v)] y 5 % de leche sin materia grasa en tampón Tris (p/v), y se incubaron una noche a 4 °C con anticuerpo Trk antifosfato pY490 (1:5000; New England Biolabs) en tampón salino Tris con Tween 20 [0.1 % (v/v)], y 5 % BSA (p/v). A continuación, las membranas se lavan tres veces durante 15 min, y se incuban con IgG de cabra anticonejo conjugado a peroxidasa (1:10000; New England Biolabs) en tampón salino Tris con Tween 20 [0.1 % (v/v)] y 5 % de leche sin materia grasa (p/v) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavan tres veces durante 15 min en tampón salino Tris con Tween 20 [0.1 % (v/v)], se aclaran con TBS, y a continuación se incuban con un reactivo de detección quimioluminescente (Amersham) durante 1 min, y se ponen en contacto con una película de autorradiografía.

Para el estudio de la capacidad de estos péptidos para inducir fosforilación de los receptores TrkB, se siguió un protocolo análogo al anterior, pero en el que no se adicionó BDNF al medio de cultivo.



## BIBLIOGRAFÍA

---



## BIBLIOGRAFÍA.

- (1) Eyster, K. M. Introduction to signal transduction: a primer for untangling the web of intracellular messengers. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 1927-1938.
- (2) Dall'Acqua, W.; Goldman, E. R.; Lin, W.; Teng, C.; Tsuchiya, D.; Li, H.; Ysern, X.; Braden, B. C.; Li, Y.; Smith-Gill, S. J.; Mariuzza, R. A. A mutational analysis of binding interactions in an antigen-antibody protein-protein complex. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7981-7991.
- (3) Holwerda, B. Activity in monomers of human cytomegalovirus protease. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1999**, *259*, 370-373.
- (4) Klemm, J. D.; Schreiber, S. L.; Crabtree, G. R. Dimerization as a regulatory mechanism in signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 569-592.
- (5) Stelzl, U.; Worm, U.; Lalowski, M.; Haenig, C.; Brembeck, F. H.; Goehler, H.; Stroedicke, M.; Zenkner, M.; Schoenherr, A.; Koeppen, S.; Timm, J.; Mintzlaff, S.; Abraham, C.; Bock, N.; Kietzmann, S.; Goedde, A.; Toksöz, E.; Droege, A.; Krobitsch, S.; Korn, B.; Birchmeier, W.; Lehrach, H.; Wanker, E. E. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* **2005**, *122*, 957-968.
- (6) Rhodes, D. R.; Tomlins, S. A.; Varambally, S.; Mahavisno, V.; Barrette, T.; Kalyana-Sundaram, S.; Ghosh, D.; Pandey, A.; Chinnaiyan, A. M. Probabilistic model of the human protein-protein interaction network. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 951-959.
- (7) Sali, A.; Glaeser, R.; Earnest, T.; Baumeister, W. From words to literature in structural proteomics. *Nature* **2003**, *422*, 216-225.
- (8) Ruffner, H.; Bauer, A.; Bouwmeester, T. Human protein-protein interaction networks and the value for drug discovery. *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 709-716.
- (9) Ryan, D. P.; Matthews, J. M. Protein-protein interactions in human disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 441-446.
- (10) Dobson, C. M. Protein folding and disease: a view from the first horizon symposium. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2003**, *2*, 154-160.
- (11) Loregian, A.; Marsden, H. S.; Palù, G. Protein-protein interactions as targets for antiviral chemotherapy. *Rev. Med. Virol.* **2002**, *12*, 239-262.
- (12) Stites, W. E. Protein-protein interactions: interface structure, binding thermodynamics, and mutational analysis. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1233-1250.
- (13) Jones, S.; Thornton, J. M. Principles of protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 13-20.
- (14) Archakov, A. I.; Govorun, V. M.; Dubanov, A. V.; Ivanov, Y. D.; Veselovsky, A. V.; Lewi, P.; Janssen, P. Protein-protein interactions as a target for drugs in proteomics. *Proteomics* **2003**, *3*, 380-391.
- (15) Jones, S.; Thornton, J. M. Protein-protein interactions: a review of protein dimer structures. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1995**, *63*, 31-59.
- (16) Ma, B.; Elkayam, T.; Wolfson, H.; Nussinov, R. Protein-protein interactions: structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 5772-5777.
- (17) Clackson, T.; Wells, J. A. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* **1995**, *267*, 383-386.
- (18) Bogan, A. A.; Thorn, K. S. Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 1-9.
- (19) Reichmann, D.; Rahat, O.; Cohen, M.; Neuvirth, H.; Schreiber, G. The molecular architecture of protein-protein binding sites. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 67-76.

- (20) DeLano, W. L. Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 14-20.
- (21) Russell, R. B.; Alber, F.; Aloy, P.; Davis, F. P.; Korkin, D.; Pichaud, M.; Topf, M.; Sali, A. A structural perspective on protein-protein interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 313-324.
- (22) Arkin, M. R.; Wells, J. A. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2004**, *3*, 301-317.
- (23) Cochran, A. G. Protein-protein interfaces: mimics and inhibitors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 654-659.
- (24) Toogood, P. L. Inhibition of protein-protein association by small molecules: approaches and progress. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1543-1558.
- (25) Berg, T. Modulation of protein-protein interactions with small organic molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2462-2481.
- (26) Boger, D. L.; Desharnais, J.; Capps, K. Solution-phase combinatorial libraries: modulating cellular signaling by targeting protein-protein or protein-DNA interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4138-4176.
- (27) Yin, H.; Hamilton, A. D. Strategies for targeting protein-protein interactions with synthetic agents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4130-4163.
- (28) Chène, P. Drugs targeting protein-protein interactions. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 400-411.
- (29) Veselovsky, A. V.; Ivanov, Y. D.; Ivanov, A. S.; Archakov, A. I.; Lewi, P.; Janssen, P. Protein-protein interactions: mechanisms and modification by drugs. *J. Mol. Recognit.* **2002**, *15*, 405-422.
- (30) Nieddu, E.; Pasa, S. Interfering with protein-protein contact: molecular interaction MAPS and peptide modulators. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 21-32.
- (31) Vaughan, T. J.; Osbourn, J. K.; Tempest, P. R. Human antibodies by design. *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 535-539.
- (32) Tyndall, J. D.; Pfeiffer, B.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. Over one hundred peptide-activated G protein-coupled receptors recognize ligands with turn structure. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 793-826.
- (33) Souroujon, M. C.; Mochly-Rosen, D. Peptide modulators of protein-protein interactions in intracellular signaling. *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 919-924.
- (34) Sidhu, S. S.; Fairbrother, W. J.; Deshayes, K. Exploring protein-protein interactions with phage display. *ChemBioChem.* **2003**, *4*, 14-25.
- (35) Sillerud, L. O.; Larson, R. S. Design and structure of peptide and peptidomimetic antagonists of protein-protein interaction. *Curr. Prot. Pept. Sci.* **2005**, *6*, 151-169.
- (36) Pérez de Vega, M. J.; Martín-Martínez, M.; González-Muñiz, R. Modulation of protein-protein interactions by stabilizing/mimicking protein secondary structure elements. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 33-62.
- (37) Peczu, M. W.; Hamilton, A. D. Peptide and protein recognition by designed molecules. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2479-2494.
- (38) Burgess, K. Solid-phase syntheses of  $\beta$ -turn analogues to mimic or disrupt protein-protein interactions. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 826-835.
- (39) Zhao, L.; Chmielewski, J. Inhibiting protein-protein interactions using designed molecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 31-34.
- (40) Che, Y.; Brooks, B. R.; Marshall, G. R. Development of small molecules designed to modulate protein-protein interactions. *J. Comp.-Aid. Mol. Des.* **2006**, *20*, 109-130.
- (41) Spear, K. L.; Brown, M. S.; Reinhard, E. J.; McMahon, E. G.; Olins, G. M.; Palomo, M. A.; Patton, D. R. Conformational restriction of angiotensin II: cyclic analogs having high potency. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1935-1940.



- (42) Rosenstrom, U.; Skold, C.; Lindeberg, G.; Botros, M.; Nyberg, F.; Karlen, A.; Hallberg, A. A selective AT<sub>2</sub> receptor ligand with a  $\gamma$ -turn-like mimetic replacing the amino acid residues 4-5 of angiotensin II. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 859-870.
- (43) García-López, M. T.; González-Muñiz, R.; Martín-Martínez, M.; Herranz, H. Strategies for design of non peptide CCK1R agonist/antagonist ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 1180-1194.
- (44) De Tullio, P.; Delarge, J.; Pirotte, B. Recent advances in the chemistry of cholecystokinin receptor ligands (agonists and antagonists). *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 433-455.
- (45) Martín-Martínez, M.; de la Figuera, N.; Latorre, M.; Herranz, R.; García-López, M. T.; Cenarruzabeitia, E.; del Río, J.; González-Muñiz, R.  $\beta$ -Turned dipeptoids as potent and selective CCK1 receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3770-3777.
- (46) Aumailley, M.; Gurrath, M.; Müller, G.; Calvete, J.; Timpl, R.; Kessler, H. Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50-54.
- (47) Bourguet, E.; Banères, J.-L.; Parello, J.; Lusinchi, X.; Girard, J.-P.; Vidal, J.-P. Nonpeptide RGD antagonists: a novel class of mimetics, the 5,8-disubstituted 1-azabicyclo[5.2.0]nonan-2-one lactam. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1561-1564.
- (48) LeSauter, L.; Wei, L.; Gibbs, B. F.; Saragovi, H. U. Small peptide mimics of nerve growth factor bind TrkA receptors and affect biological responses. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 6564-6569.
- (49) Lee, H. B.; Zaccaro, M. C.; Pattarawarapan, M.; Roy, S.; Saragovi, H. U.; Burgess, K. Syntheses and activities of new C<sup>10</sup>  $\beta$ -turn peptidomimetics. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 701-713.
- (50) Sun, H.; Nikolovska-Coleska, Z.; Yang, C.-Y.; Xu, L.; Tomita, Y.; Krajewski, K.; Roller, P. P.; Wang, S. Structure-based design, synthesis, and evaluation of conformationally constrained mimetics of the second mitochondria-derived activator of caspase that target the x-linked inhibitor of apoptosis protein/caspase-9 interaction site. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4147-4150.
- (51) Sun, H.; Nikolovska-Coleska, Z.; Yang, C.-Y.; Xu, L.; Liu, M.; Tomita, Y.; Pan, H.; Yoshioka, Y.; Krajewski, K.; Roller, P. P.; Wang, S. Structure-based design of potent, conformationally constrained smac mimetics. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16686-16687.
- (52) Newlander, K. A.; Callahan, J. F.; Moore, M. L.; Tomaszek, T. A.; Huffman, W. F. A novel constrained reduced-amide inhibitor of HIV-1 protease derived from the sequential incorporation of  $\gamma$ -turn mimetics into a model substrate. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2321-2331.
- (53) Chou, K. C. Prediction of tight turns and their types in proteins. *Anal. Biochem.* **2000**, *286*, 1-16.
- (54) Rose, G. D.; Gierasch, L. M.; Smith, J. A. Turns in peptides and proteins. *Adv. Protein. Chem.* **1985**, *37*, 1-109.
- (55) Rose, G. D. Prediction of chain turns in globular proteins on a hydrophobic basis. *Nature* **1978**, *272*, 586-590.
- (56) Kuntz, I. D. Protein folding. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4009-4012.
- (57) Kessler, H. Conformation and biological-activity of cyclic-peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, *21*, 512-523.
- (58) Che, Y.; Marshall, G. R. Engineering cyclic tetrapeptides containing chimeric amino acids as preferred reverse-turn scaffolds. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 111-124.
- (59) Brickmann, K.; Yuan, Z. Q.; Sethson, I.; Somfai, P.; Kihlberg, J. Synthesis of conformationally restricted mimetics of  $\gamma$ -turns and incorporation into desmopressin, an analogue of the peptide hormone vasopressin. *Chem.-Eur. J.* **1999**, *5*, 2241-2253.

- (60) Toniolo, C. Intramolecularly hydrogen-bonded peptide conformations. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1980**, *9*, 1-44.
- (61) Guruprasad, K.; Shukla, S. Prediction of  $\beta$ -turns from amino acid sequences using the residue-coupled model. *J. Pept. Res.* **2003**, *61*, 159-162.
- (62) Guruprasad, K.; Shukla, S.; Adindla, S.; Guruprasad, L. Prediction of  $\gamma$ -turns from amino acid sequences. *J. Pept. Res.* **2003**, *61*, 243-251.
- (63) Lewis, P. N.; Momany, F. A.; Scheraga, H. A. Chain reversals in proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *303*, 211-229.
- (64) Venkatachalam, C. M. Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425-1436.
- (65) Richardson, J. S. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Prot. Chem.* **1981**, *34*, 167-339.
- (66) Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M. A revised set of potentials for  $\beta$ -turn formation in proteins. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 2207-2216.
- (67) Wilmot, C. M.; Thornton, J. M. Analysis and prediction of the different types of  $\beta$ -turn in proteins. *J. Mol. Biol.* **1988**, *203*, 221-232.
- (68) Perczel, A.; Mcallister, M. A.; Csaszar, P.; Csizmadia, I. G. Peptide models 6. New  $\beta$ -turn conformations from AB initio calculations confirmed by X-Ray data of proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4849-4858.
- (69) Chou, P. Y.; Fasman, G. D. Empirical predictions of protein conformation. *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 251-276.
- (70) Guruprasad, K.; Rajkumar, S.  $\beta$ - and  $\gamma$ -turns in proteins revisited: a new set of amino acid turn-type dependent positional preferences and potentials. *J. Biosci.* **2000**, *25*, 143-156.
- (71) Nemethy, G.; Printz, M. P. The  $\gamma$ -Turn, a possible folded conformation of the polypeptide chain. Comparison with the  $\beta$ -turn. *Macromolecules* **1972**, *5*, 755-758.
- (72) Bystrov, V. F.; Portnova, S. L.; Tsetlin, V. I.; Ivanov, V. T.; Ovchinnikov, Y. A. Conformational studies of peptide systems: the rotational states of the NH---CH fragment of alanine dipeptides by nuclear magnetic resonance. *Tetrahedron* **1969**, *25*, 493-515.
- (73) Milner-White, E. J.; Ross, B. M.; Ismail, R.; Belhadj-Mostefa, K.; Poet, R. One type of  $\gamma$ -turn, rather than the other gives rise to chain-reversal in proteins. *J. Mol. Biol.* **1988**, *204*, 777-782.
- (74) Milner-White, E. J. Situations of  $\gamma$ -turns in proteins: their relation to  $\alpha$ -helices,  $\beta$ -sheets and ligand binding sites. *J. Mol. Biol.* **1990**, *216*, 385-397.
- (75) Giannis, A.; Kolter, T. Peptidomimetics for receptor ligands-discovery, development, and medical perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1244-1267.
- (76) Gardner, B.; Nakanishi, H.; Kahn, M. Conformationally constrained nonpeptide  $\beta$ -turn mimetics of enkephalin. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3433-3448.
- (77) Olson, G. L.; Voss, M. E.; Hill, D. E.; Kahn, M.; Madison, V. S.; Cook, C. M. Design and synthesis of a protein  $\beta$ -turn mimetic. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 323-333.
- (78) Blomberg, D.; Hedenstrom, M.; Kreye, P.; Sethson, I.; Brickmann, K.; Kihlberg, J. Synthesis and conformational studies of a  $\beta$ -turn mimetic incorporated in Leu-enkephalin. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3500-3508.
- (79) Freidinger, R. M.; Veber, D. F.; Perlow, D. S.; Brooks, J. R.; Saperstein, R. Bioactive conformation of luteinizing hormone-releasing hormone: evidence from a conformationally constrained analog. *Science* **1980**, *210*, 656-658.
- (80) Freidinger, R. M.; Perlow, D. S.; Veber, D. F. Protected lactam-bridged dipeptides for use as conformational constraints in peptides. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 104-109.
- (81) Nagai, U.; Sato, K.; Nakamura, R.; Kato, R. Bicyclic turned dipeptide (BTD) as a  $\beta$ -turn mimetic; its design, synthesis and incorporation into bioactive peptides. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3577-3592.

- (82) Sato, K.; Nagai, U. Synthesis and antibiotic activity of a gramicidin S analogue containing bicyclic  $\beta$ -turn dipeptides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1986**, 1231-1234.
- (83) Genin, M. J.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. Dopamine receptor modulation by a highly rigid spiro bicyclic peptidomimetic of Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3481-3483.
- (84) Somu, R. V.; Johnson, R. L. Synthesis of pipecolic acid-based spiro bicyclic lactam scaffolds as  $\beta$ -turn mimics. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5954-5963.
- (85) Andreu, D.; Ruiz, S.; Carreño, C.; Alsina, J.; Albericio, F.; Jiménez, M. A.; de la Figuera, N.; Herranz, R.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R. IBTM-containing gramicidin S analogues: evidence for IBTM as a suitable type II'  $\beta$ -turn mimetic. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10579-10586.
- (86) Rosenstrom, U.; Skold, C.; Lindeberg, G.; Botros, M.; Nyberg, F.; Karlen, A.; Hallberg, A. Design, synthesis, and incorporation of a  $\beta$ -turn mimetic in angiotensin II forming novel pseudopeptides with affinity for AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6133-6137.
- (87) Crisma, M.; Moretto, A.; De Zotti, M.; Formaggio, F.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Toniolo, C. Turn stabilization in short peptides by C $^{\alpha}$ -methylated  $\alpha$ -amino acids. *Biopolymers* **2005**, *80*, 279-293.
- (88) Jiménez, A. I.; Cativiela, C.; Aubry, A.; Marraud, M.  $\beta$ -Turn preferences induced by 2,3-methanophenylalanine chirality. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9452-9459.
- (89) Toniolo, C.; Crisma, M.; Formaggio, F.; Benedetti, E.; Santini, A.; Iacovino, R.; Saviano, M.; Di Blasio, B.; Pedone, C.; Kamphuis, J. Preferred conformation of peptides rich in alicyclic C $^{\alpha}$ , $^{\alpha}$ -disubstituted glycines. *Biopolymers* **1996**, *40*, 519-522.
- (90) Jiménez, A. I.; Cativiela, C.; Gómez-Catalán, J.; Pérez, J. J.; Aubry, A.; Paris, M.; Marraud, M. Influence of side chain restriction and NH- $\pi$  interaction on the  $\beta$ -turn folding modes of dipeptides incorporating phenylalanine cyclohexane derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5811-5821.
- (91) Avenoz, A.; Busto, J. H.; Cativiela, C.; Peregrina, J. M.; Rodríguez, F.  $\beta$ -Turn modulation by the incorporation of c<sub>6</sub>Ser into Xaa-Pro dipeptide. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1429-1432.
- (92) Kishore, R.; Balaram, P. Stabilization of  $\gamma$ -turn conformations in peptides by disulfide bridging. *Biopolymers* **1985**, *24*, 2041-2043.
- (93) Callahan, J. F.; Bean, J. W.; Burgess, J. L.; Eggleston, D. S.; Hwang, S. M.; Kopple, K. D.; Koster, P. F.; Nichols, A.; Peishoff, C. E.; Samanen, J. M.; Vasko, J. A.; Wong, A.; Huffman, W. F. Design and synthesis of a C7 mimetic for the predicted  $\gamma$ -turn conformation found in several constrained RGD antagonists. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3970-3972.
- (94) Callahan, J. F.; Newlander, K. A.; Burgess, J. L.; Eggleston, D. S.; Nichols, A.; Wong, A.; Huffman, W. F. The use of  $\gamma$ -turn mimetics to define peptide secondary structure. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3479-3488.
- (95) Samanen, J. M.; Ali, F. E.; Barton, L. S.; Bondinell, W. E.; Burgess, J. L.; Callahan, J. F.; Calvo, R. R.; Chen, W.; Chen, L.; Erhard, K.; Feuerstein, G.; Heys, R.; Hwang, S.-M.; Jakas, D. R.; Keenan, R. M.; Ku, T. W.; Kwon, C.; Lee, C.-P.; Miller, W. H.; Newlander, K. A.; Nichols, A.; Parker, M.; Peishoff, C. E.; Rhodes, G.; Ross, S.; Shu, A.; Simpson, R.; Takata, D.; Yellin, T. O.; Uzsinskas, I.; Venslavsky, J. W.; Yuan, C.-K.; Huffman, W. F. Potent, selective, orally active 3-oxo-1,4-benzodiazepine GPIIb/IIIa integrin antagonists. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4867-4870.
- (96) Keenan, R. M.; Callahan, J. F.; Samanen, J. M.; Bondinell, W. E.; Calvo, R. R.; Chen, L.; DeBrosse, C.; Eggleston, D. S.; Haltiwanger, R. C.; Hwang, S. M.; Jakas, D. R.; Ku, T. W.; Miller, W. H.; Newlander, K. A.; Nichols, A.; Parker, M. F.; Southhall, L. S.

- Uzinskas, I.; Vasko-Moser, J. A.; Venslavsky, J. W.; Wong, A. S.; Huffman, W. F. Conformational preferences in a benzodiazepine series of potent nonpeptide fibrinogen receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 545-559.
- (97) Fenster, E.; Rayabarapu, D. K.; Zhang, M.; Mukherjee, S.; Hill, D.; Neuenswander, B.; Schoenen, F.; Hanson, P. R.; Aubé, J. Three-component synthesis of 1,4-diazepin-5-ones and the construction of  $\gamma$ -turn-like peptidomimetic libraries. *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 230-234.
- (98) Schmidt, B.; Lindman, S.; Tong, W.; Lindeberg, G.; Gogoll, A.; Lai, Z.; Thornwall, M.; Synnergren, B.; Nilsson, A.; Welch, C. J.; Sohtell, M.; Westerlund, C.; Nyberg, F.; Karlen, A.; Hallberg, A. Design, synthesis, and biological activities of four angiotensin II receptor ligands with  $\gamma$ -turn mimetics replacing amino acid residues 3-5. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 903-919.
- (99) Herrero, S.; García-López, M. T.; Latorre, M.; Cenarruzabeitia, E.; del Río, J.; Herranz, R. 2-Oxopiperazine-based  $\gamma$ -turn conformationally constrained peptides: synthesis of CCK-4 analogues. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3866-3873.
- (100) Georgsson, J.; Skold, C.; Plouffe, B.; Lindeberg, G.; Botros, M.; Larhed, M.; Nyberg, F.; Gallo-Payet, N.; Gogoll, A.; Karlen, A.; Hallberg, A. Angiotensin II pseudopeptides containing 1,3,5-trisubstituted benzene scaffolds with high AT<sub>2</sub> receptor affinity. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6620-6631.
- (101) Burgess, K.; Ho, K.-K.; Pettitt, B. M. A  $\gamma$ -turn structure induced by 2*S*, 3*S*-2,3-methanomethionine. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 799-800.
- (102) Jiménez, A. I.; Ballano, G.; Cativiela, C. First observation of two consecutive  $\gamma$ -turns in a crystalline linear dipeptide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 396-399.
- (103) Bonache, M. A.; Gerona-Navarro, G.; García-Aparicio, C.; Alías, M.; Martín-Martínez, M.; García-López, M. T.; López, P.; Cativiela, C.; González-Muñiz, R. Memory of chirality in the stereoselective synthesis of  $\beta$ -lactams: importance of the starting amino acid derivative. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2161-2169.
- (104) Bonache, M. A.; Gerona-Navarro, G.; Martín-Martínez, M.; García-López, M. T.; López, P.; Cativiela, C.; González-Muñiz, R. Memory of chirality in the enantioselective synthesis of  $\beta$ -lactams derived from amino acids. Influence of the reaction conditions. *Synlett* **2003**, 1007-1011.
- (105) Gerona-Navarro, G.; Bonache, M. A.; Alías, M.; Pérez de Vega, M. J.; García-López, M. T.; López, P.; Cativiela, C.; González-Muñiz, R. Simple access to novel azetidine-containing conformationally restricted amino acids by chemoselective reduction of  $\beta$ -lactams. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2193-2196.
- (106) Gerona-Navarro, G.; Bonache, M. A.; Herranz, R.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R. Entry to new conformationally constrained amino acids. First synthesis of 3-unsubstituted 4-alkyl-4-carboxy-2-azetidinone derivatives via an intramolecular N( $\alpha$ )-C( $\alpha$ )-cyclization strategy. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3538-3547.
- (107) Gerona-Navarro, G.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R. General approach for the stereocontrolled construction of the  $\beta$ -lactam ring in amino acid-derived 4-alkyl-4-carboxy-2-azetidinones. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3953-3956.
- (108) Gerona-Navarro, G.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R. Easy access to orthogonally protected  $\alpha$ -alkyl aspartic acid and  $\alpha$ -alkyl asparagine derivatives by controlled opening of  $\beta$ -lactams. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6145-6148.
- (109) Gerona-Navarro, G.; Royo, M.; García-López, M. T.; Albericio, F.; González-Muñiz, R. Exploring solid-phase approaches for the preparation of new  $\beta$ -lactams from amino acids. *Mol. Divers.* **2003**, *6*, 75-84.
- (110) Pérez-Faginas, P.; O'Reilly, F.; O'Byrne, A.; García-Aparicio, C.; Martín-Martínez, M.; Pérez de Vega, M. J.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R. Exceptional

- stereoselectivity in the synthesis of 1,3,4-trisubstituted 4-carboxy  $\beta$ -lactam derivatives from amino acids. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1593-1596.
- (111) Obrecht, D.; Altorfer, M.; Lehmann, C.; Schonholzer, P.; Muller, K. An efficient strategy to orthogonally protected (*R*)- and (*S*)- $\alpha$ -methyl(alkyl)serine-containing peptides via a novel azlactone/oxazoline interconversion reaction. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4080-4086.
- (112) Mazaleyra, J.-P.; Boutboul, A.; Lebars, Y.; Gaucher, A.; Wakselman, M. Practical resolution of an atropoisomeric  $\alpha,\alpha$ -disubstituted glycine with L-phenylalanine cyclohexylamide as chiral auxiliary. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 2701-2713.
- (113) Cativiela, C.; Díaz de Villegas, M. D.; Gálvez, J. A. Synthesis and chemical resolution of unique  $\alpha,\beta$ -didehydroamino acids with a chiral axis. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1027-1030.
- (114) Cativiela, C.; Díaz de Villegas, M. D.; Gálvez, J. A.; Su, G. Synthesis and conformational properties of model dipeptides containing novel axially chiral  $\alpha,\beta$ -didehydroamino acids at the (i+1) position of a  $\beta$ -turn conformation. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11923-11932.
- (115) Spaggiari, A.; Blaszczyk, L. C.; Prati, F. Low-temperature deacylation of *N*-monosubstituted amides. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3885-3888.
- (116) Karoyan, P.; Sagan, S.; Clodic, G.; Lavielle, S.; Chassaing, G. Asymmetric synthesis of Boc-*N*-methyl-*p*-benzoyl-phenylalanine. Preparation of a photoreactive antagonist of substance P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1369-1374.
- (117) Oppolzer, W.; Blagg, J.; Rodriguez, I.; Walther, E. Bornane sultam-directed asymmetric synthesis of crystalline, enantiomerically pure syn aldols. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2767-2772.
- (118) Lin, J.; Chan, W. H.; Lee, A. W. M.; Wong, W. Y. Asymmetric alkylation mediated by tricyclic chiral sultam auxiliaries. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 13983-13998.
- (119) Oppolzer, W.; Moretti, R.; Thomi, S. Asymmetric alkylations of a sultam-derived glycinate equivalent: practical preparation of enantiomerically pure  $\alpha$ -amino acids. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6009-6010.
- (120) Tunoori, A. R.; White, J. M.; Georg, G. I. A one-flask synthesis of Weinreb amides from chiral and achiral carboxylic acids using the deoxo-fluor fluorinating reagent. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 4091-4093.
- (121) Ingenito, R.; Dreznjak, D.; Guffler, S.; Wenschuh, H. Efficient loading of sulfonamide safety-catch linkers by Fmoc amino acid fluorides. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1187-1188.
- (122) Bertho, J.-N.; Loffet, A.; Pinel, C.; Reuther, F.; Sennyey, G. Amino acid fluorides: their preparation and use in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1303-1306.
- (123) Savrda, J.; Chertanova, L.; Wakselman, M. Activation of *N,N*-bis(alkoxycarbonyl) amino acids. Synthesis of *N*-alkoxycarbonyl amino acid *N*-carboxyanhydrides and *N,N*-dialkoxycarbonyl amino acid fluorides, and the behavior of these amino acid derivatives. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 5309-5322.
- (124) Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Winter, R.; Bienert, M.; Ionescu, D.; Carpino, L. A. Fmoc amino acid fluorides in peptide synthesis - extension of the method to extremely hindered amino acids. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5483-5486.
- (125) Carpino, L. A.; Mansour, E.-S. M. E.; Sadat-Aalae, D. *tert*-Butyloxycarbonyl and benzyloxycarbonyl amino acid fluorides. New, stable rapid-acting acylating agents for peptide synthesis. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2611-2614.
- (126) Carpino, L. A.; Ionescu, D.; El-Faham, A.; Henklein, P.; Wenschuh, H.; Bienert, M.; Beyermann, M. Protected amino acid chlorides vs protected amino acid fluorides: reactivity comparisons. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 241-244.
- (127) Venkataraman, K.; Wagle, D. R. Cyanuric chloride: a useful reagent for converting carboxylic acids into chlorides, esters, amides and peptides. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 3037-3040.

- (128) Carpino, L. A.; Ionescu, D.; El-Faham, A.; Beyermann, M.; Henklein, P.; Hanay, C.; Wenschuh, H.; Bienert, M. Complex polyfluoride additives in Fmoc-amino acid fluoride coupling processes. Enhanced reactivity and avoidance of stereomutation. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 975-977.
- (129) Carpino, L. A.; El-Faham, A. Tetramethylfluoroformamidinium hexafluorophosphate: a rapid-acting peptide coupling reagent for solution and solid phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5401-5402.
- (130) Kawabata, T.; Kawakami, S.; Majumdar, S. Asymmetric cyclization via memory of chirality: a concise access to cyclic amino acids with a quaternary stereocenter. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13012-13013.
- (131) Belvisi, L.; Gennari, C.; Mielgo, A.; Potenza, D.; Scolastico, C. Conformational preferences of peptides containing reverse-turn mimetic bicyclic lactams: Inverse  $\gamma$ -turns versus type-II '  $\beta$ -turns - insights into  $\beta$ -hairpin stability. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 389-400.
- (132) Halab, L.; Lubell, W. D. Effect of sequence on peptide geometry in 5-tert-butylprolyl type VI  $\beta$ -turn mimics. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2474-2484.
- (133) Lee, Y. C.; Jackson, P. L.; Jablonsky, M. J.; Muccio, D. D.; Pfister, R. R.; Haddox, J. L.; Sommers, C. I.; Anantharamaiah, G. M.; Chaddha, M. NMR conformational analysis of *cis* and *trans* proline isomers in the neutrophil chemoattractant, *N*-acetyl-proline-glycine-proline. *Biopolymers* **2001**, *58*, 548-561.
- (134) Breznik, M.; Grdadolnik, S. G.; Giester, G.; Leban, I.; Kikelj, D. Influence of chirality of the preceding acyl moiety on the *cis/trans* ratio of the proline peptide bond. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7044-7050.
- (135) Ishimoto, B.; Tonan, K.; Ikawa, S. Coupling of intramolecular hydrogen bonding to the *cis*-to-*trans* isomerization of a proline imide bond of small model peptides. *Spectrochim. Acta A* **2000**, *56*, 201-209.
- (136) Beausoleil, E.; Lubell, W. D. Steric effects on the amide isomer equilibrium of prolyl peptides. Synthesis and conformational analysis of *N*-acetyl-5-tert-butylproline *N*-methylamides. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12902-12908.
- (137) MacArthur, M. W.; Thornton, J. M. Influence of proline residues on protein conformation. *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 397-412.
- (138) Vass, E.; Hollosi, M.; Besson, F.; Buchet, R. Vibrational spectroscopic detection of  $\beta$ - and  $\gamma$ -turns in synthetic and natural peptides and proteins. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1917-1954.
- (139) Schubert, M.; Labudde, D.; Oschkinat, H.; Schmieder, P. A software tool for the prediction of Xaa-Pro peptide bond conformations in proteins based on  $^{13}\text{C}$  chemical shift statistics. *J. Biomol. NMR* **2002**, *24*, 149-154.
- (140) Montelione, G. T.; Hughes, P.; Clardy, J.; Scheraga, H. A. Conformational properties of 2,4-methanoproline (2-carboxy-2,4-methanopyrrolidine) in peptides - determination of preferred peptide-bond conformation in aqueous-solution by proton overhauser measurements. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6765-6773.
- (141) Shin, Y. A.; Han, S. J.; Kang, Y. K. Conformational study on proline-containing tripeptides of ribonuclease T<sub>1</sub>. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 9248-9258.
- (142) Mutter, M.; Wöhr, T.; Gioria, S.; Keller, M. Pseudo-prolines: induction of *cis/trans*-conformational interconversion by decreased transition state barriers. *Biopolymers* **1999**, *51*, 121-128.
- (143) Madison, V.; Kopple, K. D. Solvent-dependent conformational distributions of some dipeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4855-4863.
- (144) Stimson, E. R.; Zimmerman, S. S.; Scheraga, H. A. Conformational studies of oligopeptides containing proline and glycine. *Macromolecules* **1977**, *10*, 1049-1060.

- (145) Higashijima, T.; Tasumi, M.; Miyazawa, T.  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance studies of *N*-acetyl-L-proline *N*-methylamide. Molecular conformations, hydrogen bondings, and thermodynamic quantities in various solvents. *Biopolymers* **1977**, *16*, 1259-1270.
- (146) Madison, V.; Schellman, J. Location of proline derivatives in conformational space. I. Conformational calculations; optical activity and NMR experiments. *Biopolymers* **1970**, *9*, 511-567.
- (147) Kang, Y. K.; Park, H. S. Comparative conformational study of *N*-acetyl-*N'*-methylprolineamide with different basis sets. *J. Mol. Struct.-Theochem* **2002**, *593*, 55-64.
- (148) Dörr, A.; Lubell, W. D. Synthesis of a new  $\pi$ -deficient phenylalanine derivative from a common 1,4-diketone intermediate and study of the influence of aromatic density on prolyl amide isomer population. *Biopolymers* **2007**, *88*, 290-299.
- (149) Moraczewski, A. L.; Banaszynski, L. A.; From, A. M.; White, C. E.; Smith, B. D. Using hydrogen bonding to control carbamate C-N rotamer equilibria. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7258-7262.
- (150) Molcanov, K.; Kojic-Prodic, B.; Raos, N. Analysis of the less common hydrogen bonds involving ester oxygen  $\text{sp}^3$  atoms as acceptors in the crystal structures of small organic molecules. *Acta Cryst. B* **2004**, *60*, 424-432.
- (151) Meyer, E. A.; Castellano, R. K.; Diederich, F. Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1210-1250.
- (152) Thomas, K. A.; Smith, G. M.; Thomas, T. B.; Feldmann, R. J. Electronic distributions within protein phenylalanine aromatic rings are reflected by the three-dimensional oxygen atom environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1982**, *79*, 4843-4847.
- (153) Jain, A.; Purohit, C. S.; Verma, S.; Sankaramakrishnan, R. Close contacts between carbonyl oxygen atoms and aromatic centers in protein structures:  $\pi\cdots\pi$  or lone-pair $\cdots\pi$  interactions? *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 8680-8683.
- (154) Marraud, M.; Aubry, A. Crystal structures of peptides and modified peptides. *Biopolymers* **1996**, *40*, 45-83.
- (155) Toniolo, C.; Valle, G.; Crisma, M.; Kaltenbronn, J. S.; Repine, J. T.; Van Binst, G.; Elseviers, M.; Tourwe, D.  $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$  backbone-modified peptides: first unequivocal observation of a C7 structure in a linear peptide. *Pept. Res.* **1989**, *2*, 332-337.
- (156) Grand, V.; Aubry, A.; Dupont, V.; Vicherat, A.; Marraud, M. Folded structures in protonated reduced dipeptides. *J. Pept. Sci.* **1996**, *2*, 381-391.
- (157) Vasudev, P. G.; Ananda, K.; Chatterjee, S.; Aravinda, S.; Shamala, N.; Balaram, P. Hybrid peptide design. Hydrogen bonded conformations in peptides containing the stereochemically constrained  $\gamma$ -amino acid residue, gabapentin. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4039-4048.
- (158) Jiménez, A. I.; Cativiela, C.; Marraud, M. A  $\gamma$ -turn induced by a highly constrained cyclopropane analogue of phenylalanine ( $\text{c}_3\text{diPhe}$ ) in the solid state. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5353-5356.
- (159) Jiménez, A. I.; Cativiela, C.; Paris, M.; Peregrina, J. M.; Avenoza, A.; Aubry, A.; Marraud, M.  $\beta$ -Turn modulation by the cyclohexane analogues of phenylalanine. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7841-7844.
- (160) Tesis doctoral de Guillermo Gerona-Navarro. Generación de diversidad molecular a partir de aminoácidos. Síntesis y aplicaciones de nuevas  $\beta$ -lactamas e hidantoínas. Universidad Complutense de Madrid. **2002**.
- (161) Chao, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 299-309.
- (162) Bibel, M.; Barde, Y.-A. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 2919-2937.

- (163) Cohen, S.; Levi-Montalcini, R. A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1956**, *42*, 571-574.
- (164) Cowan, W. M. Viktor Hamburger and Rita Levi-Montalcini: the path to the discovery of nerve growth factor. *Annu. Rev. Neurosci.* **2001**, *24*, 551-600.
- (165) Pattarawarapan, M.; Burgess, K. Molecular basis of neurotrophin-receptor interactions. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5277-5291.
- (166) Hallböök, F. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1999**, *9*, 616-621.
- (167) Bradshaw, R. A.; Murray-Rust, J.; Ibáñez, C. F.; McDonald, N. Q.; Lapatto, R.; Blundell, T. L. Nerve growth factor: structure/function relationships. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 1901-1913.
- (168) McDonald, N. Q.; Lapatto, R.; Rust, J. M.; Gunning, J.; Wlodawer, A.; Blundell, T. L. New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* **1991**, *354*, 411-414.
- (169) Longo, F. M.; Xie, Y.; Massa, M. Neurotrophin small molecule mimetics: candidate therapeutic agents for neurological disorders. *Curr. Med. Chem.-Central Nervous System Agents* **2005**, *5*, 29-41.
- (170) Huang, E. J.; Reichardt, L. F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 609-642.
- (171) Teng, K. K.; Hempstead, B. L. Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 35-48.
- (172) Wehrman, T.; He, X.; Raab, B.; Dukipatti, A.; Blau, H.; García, K. C. Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron* **2007**, *53*, 25-38.
- (173) Ultsch, M. H.; Wiesmann, C.; Simmons, L. C.; Henrich, J.; Yang, M.; Reilly, D.; Bass, S. H.; de Vos, A. M. Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*, 149-159.
- (174) Fan, G.; Jaenisch, R.; Kucera, J. A role for p75 receptor in neurotrophin-3 functioning during the development of limb proprioception. *Neuroscience* **1999**, *90*, 259-268.
- (175) Liepinsh, E.; Ilag, L. L.; Otting, G.; Ibáñez, C. F. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J.* **1996**, *16*, 4999-5005.
- (176) Wiesmann, C.; de Vos, A. M. Nerve growth factor: structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 748-759.
- (177) Yano, H.; Chao, M. V. Neurotrophin receptor structure and interactions. *Pharm. Acta Helv.* **2000**, *74*, 253-260.
- (178) Bruno, M. A.; Clarke, P. B. S.; Seltzer, A.; Quirion, R.; Burgess, K.; Cuello, A. C.; Saragovi, H. U. Long-lasting rescue of age-associated deficits in cognition and the CNS cholinergic phenotype by a partial agonist peptidomimetic ligand of TrkA. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 8009-8018.
- (179) Barinaga, M. Neurotrophic factors enter the clinic. *Science* **1994**, *264*, 772-774.
- (180) Saragovi, H. U.; Burgess, K. Small molecule and protein-based neurotrophic ligands: agonists and antagonists as therapeutic agents. *Exp. Opin. Ther. Patents* **1999**, *9*, 737-751.
- (181) Apfel, S. C. Nerve growth factor for the treatment of diabetic neuropathy: what went wrong, what went right, and what does the future hold? *Int. Rev. Neurobiol.* **2002**, *50*, 393-413.
- (182) De Rosa, R.; García, A. A.; Braschi, C.; Capsoni, S.; Maffei, L.; Berardi, N.; Cattaneo, A. Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 3811-3816.
- (183) Knusel, B.; Beck, K. D.; Winslow, J. W.; Rosenthal, A.; Burton, L. E.; Widmer, H. R.; Nikolics, K.; Hefti, F. Brain-derived neurotrophic factor administration protects basal



- forebrain cholinergic but not nigral dopaminergic neurons from degenerative changes after axotomy in the adult rat brain. *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 4391-4402.
- (184) Hefti, F. Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transections. *J. Neurosci.* **1986**, *6*, 2155-2162.
- (185) Nakagawara, A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett.* **2001**, *169*, 107-114.
- (186) Festuccia, C.; Gravina, G. L.; Muzi, P.; Pomante, R.; Ventura, L.; Ricevuto, E.; Vicentini, C.; Bologna, M. In vitro and in vivo effects of bicalutamide on the expression of TrkA and p75 neurotrophin receptors in prostate carcinoma. *Prostate* **2007**, *67*, 1255-1264.
- (187) Weeraratna, A. T.; Arnold, J. T.; George, D. J.; Demarzo, A.; Isaacs, J. T. Rational basis for Trk inhibition therapy for prostate cancer. *Prostate* **2000**, *45*, 140-148.
- (188) Sugimoto, T.; Kuroda, H.; Horii, Y.; Moritake, H.; Tanaka, T.; Hattori, S. Signal transduction pathways through TrkA and TrkB receptors in human neuroblastoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **2001**, *92*, 152-160.
- (189) Halvorson, K. G.; Kubota, K.; Sevcik, M. A.; Lindsay, T. H.; Sotillo, J. E.; Ghilardi, J. R.; Rosol, T. J.; Boustany, L.; Shelton, D. L.; Mantyh, P. W. A blocking antibody to nerve growth factor attenuates skeletal pain induced by prostate tumor cells growing in bone. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 9426-9435.
- (190) Ibáñez, C. F.; Ilag, L. L.; Murray-Rust, J.; Persson, H. An extended surface of binding to Trk tyrosine kinase receptors in NGF and BDNF allows the engineering of a multifunctional pan-neurotrophin. *EMBO J.* **1993**, *12*, 2281-2293.
- (191) Wiesmann, C.; Ultsch, M. H.; Bass, S. H.; de Vos, A. M. Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* **1999**, *401*, 184-188.
- (192) Banfield, M. J.; Naylor, R. L.; Robertson, A. G. S.; Allen, S. J.; Dawbarn, D.; Brady, R. L. Specificity in Trk receptor: neurotrophin interactions the crystal structure of TrkB-d5 in complex with neurotrophin-4/5. *Structure* **2001**, *9*, 1191-1199.
- (193) O'Leary, P. D.; Hughes, R. A. Structure-activity relationships of conformationally constrained peptide analogues of loop 2 of brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 1712-1721.
- (194) Robinson, R. C.; Radziejewski, C.; Spraggon, G.; Greenwald, J.; Kostura, M. R.; Burtnick, L. D.; Stuart, D. I.; Choe, S.; Jones, E. Y. The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 2589-2597.
- (195) Shamovsky, I. L.; Ross, G. M.; Riopelle, R. J.; Weaver, D. F. The interaction of neurotrophins with the p75<sup>NTR</sup> common neurotrophin receptor: a comprehensive molecular modeling study. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 2223-2233.
- (196) Fletcher, J. M.; Hughes, R. A. Novel monocyclic and bicyclic loop mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 515-524.
- (197) O'Leary, P. D.; Hughes, R. A. Design of potent peptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 25738-25744.
- (198) Peleshok, J.; Saragovi, H. U. Functional mimetics of neurotrophins and their receptors. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*.
- (199) Maliartchouk, S.; Debeir, T.; Beglova, N.; Cuello, A. C.; Gehring, K.; Saragovi, H. U. Genuine monovalent ligands of TrkA nerve growth factor receptors reveal a novel pharmacological mechanism of action. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9946-9956.
- (200) Xie, Y.; Tisi, M. A.; Yeo, T. T.; Longo, F. M. Nerve growth factor (NGF) loop 4 dimeric mimetics activate ERK and AKT and promote NGF-like neurotrophic effects. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29868-29874.

- (201) Longo, F. M.; Manthorpe, M.; Xie, Y. M.; Varon, S. Synthetic NGF peptide derivatives prevent neuronal death via a p75 receptor-dependent mechanism. *J. Neurosci. Res.* **1997**, *48*, 1-17.
- (202) Maliartchouk, S.; Feng, Y.; Ivanisevic, L.; Debeir, T.; Cuello, A. C.; Burgess, K.; Saragovi, H. U. A designed peptidomimetic agonistic ligand of TrkA nerve growth factor receptors. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 385-391.
- (203) Angell, Y.; Chen, D.; Brahimi, F.; Saragovi, H. U.; Burgess, K. A combinatorial method for solution-phase synthesis of labeled bivalent  $\beta$ -turn mimics. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 556-565.
- (204) Baeza, J. L.; Gerona-Navarro, G.; Pérez de Vega, M. J.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R.; Martín-Martínez, M. 2-Alkyl-2-carboxy-azetidines as scaffolds for the induction of  $\gamma$ -turns. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3689-3693.
- (205) Baeza, J. L.; Gerona-Navarro, G.; Pérez de Vega, M. J.; García-López, M. T.; González-Muñiz, R.; Martín-Martínez, M. Azetidine-derived amino acids versus proline derivatives. Alternative trends in reverse turn induction. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1704-1715.
- (206) He, X.; García, K. C. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* **2004**, *304*, 870-875.
- (207) Beglova, N.; Maliartchouk, S.; Ekiel, I.; Zaccaro, M. C.; Saragovi, H. U.; Gehring, K. Design and solution structure of functional peptide mimetics of nerve growth factor. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3530-3540.
- (208) Bonsnes, R. W.; Taussky, H. H. On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffe reaction. *J. Biol. Chem.* **1945**, *158*, 581-591.
- (209) Cierpicki, T.; Otlewski, J. Amide proton temperature coefficients as hydrogen bond indicators in proteins. *J. Biomol. RMN* **2001**, *21*, 249-261.
- (210) Baxter, N. J.; Williamson, M. P. Temperature dependence of  $^1\text{H}$  chemical shifts in proteins. *J. Biomol. RMN* **1997**, *9*, 359-369.
- (211) Jiménez, M. A.; Nieto, J. L.; Rico, M.; Santoro, J.; Herranz, J.; Bermejo, F. J. A study of the NH NMR signals of Gly-Gly-X-Ala tetrapeptides in  $\text{H}_2\text{O}$  at low temperature. *J. Mol. Struct.* **1986**, *143*, 435-438.
- (212) Tesis doctoral de M<sup>a</sup> Ángeles Bonache de Marcos.  $\beta$ -lactamas derivadas de aminoácidos: síntesis enantioselectiva, transformaciones y aplicaciones químico-médicas. Universidad Complutense de Madrid. **2005**.